

**Coxaler Spinnenmuskel *c2*:
heterogener Faseraufbau und funktioneller Beitrag
bei verschiedenen Bewegungsweisen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christiane Bickeböller
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

2005

(D 30)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. D. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. E.-A. Seyfarth, Prof. Dr. M. Kössl

Datum der Disputation: 14.07.2005

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Einleitung	6
Material und Methoden	10
I. <i>Versuchstiere</i>	10
II. <i>Präparationen zur Muskelanatomie</i>	10
III. <i>Fasertypisierung durch Histochemie</i>	10
IV. <i>Sarkomerlängenmessungen mit Laserlicht</i>	14
V. <i>Proteinanalyse typisierter Muskelfasern mit SDS-Gelelektrophorese</i>	15
VI. <i>Darstellung der c2-Motoneurone durch „Backfills“</i>	19
VII. <i>GABA-Immuncytochemie</i>	21
VIII. <i>Elektromyogramme</i>	21
Ergebnisse	24
I. <i>Für die Funktion des Coxamuskels c2 wichtige anatomische Eigenschaften</i>	24
II. <i>c2 ist aus Fasern mit heterogenen Eigenschaften aufgebaut</i>	28
III. <i>Innervation des c2-Muskels</i>	48
IV. <i>Aktivität des c2-Muskels in ausgewählten Verhaltensweisen</i>	55
Diskussion	65
I. <i>Funktionelle Charakterisierung des c2-Muskels</i>	65
II. <i>Die polyneurale Innervation gewährleistet eine fasertypspezifische und verhaltensadäquate Rekrutierung</i>	80
III. <i>Vorderbeine versus Hinterbeine: mögliche Auswirkungen der c2-Zweiteilung</i>	86
IV. <i>Offene Fragen und Ausblick</i>	99

Anhang

AI. Arbeitsanleitungen und Rezepte 101

AII. Charakterisierung des internen Gelenkrezeptors R_0 112

Literaturverzeichnis 130

Danksagung 141

Lebenslauf 142

Zusammenfassung

Die mittelamerikanische Jagdspinne *Cupiennius salei* Keys. zeigt nach Reizung ventraler Tasthaare auf den proximalen Beingliedern in freier Natur und auch im Labor das relativ einfache, reflektorische Verhalten des „Körperanhebens“. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den am Körperanheben maßgeblich beteiligten Coxamuskeln *c2* hinsichtlich seiner Anatomie, seiner funktionellen Faserzusammensetzung und Innervation sowie seiner Aktivität beim „Körperanheben“ und bei weiteren Bewegungsweisen der Spinne zu untersuchen.

(1) Der *c2*-Muskel liegt im Prosoma der Spinne und setzt für jedes Bein am anterioren Coxarand an. In den 1.–3. Beinpaaren liegt *c2* zweigeteilt (apodemaler und tergaler Anteil), im Hinterbeinpaar dagegen einteilig (nur tergaler Anteil) vor.

(2) Histochemische Nachweisreaktionen (Glykogengehalt, relative Succinatdehydrogenase- und relative myofibrilläre Adenosintriphosphatase-Aktivität) ergeben eine heterogene Faserzusammensetzung des *c2*-Muskels aus 4 Muskelfasertypen (A, B, C, D). Der apodemale *c2*-Anteil besteht homogen aus A-Fasern.

(3) Messungen mit Laserdiffraktometrie zeigen für die A- und B-Fasern signifikant kürzere Sarkomerlängen als für die C- und D-Fasern.

(4) Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weist als Besonderheit für die A- und B-Fasern eine Paramyosin-Isoform P₁ (107 kDa), eine Isoform der leichten Ketten des Myosins LC₂ (22 kDa) und vermehrt eine Troponin-Isoform T₄ (46 kDa) nach. In den C- und D-Fasern kommt allein eine 43-kDa-Bande und vermehrt eine Troponin-Isoform T₂ (50 kDa) vor.

(5) Der *c2*-Muskel der Vorder- und Hinterbeine wird durch einen eigenen Nerv innerviert. Retrograde Anfüllungen („Backfills“) des Nervs mit neuronalen Tracern legen eine polyneurale Innervation des *c2*-Muskels aller Beine dar, höchstwahrscheinlich jeweils durch 6

Motoneurone. Zwei davon sind jeweils positiv GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) -immun-reaktiv; dies ist ein Hinweis auf eine mögliche inhibitorische Innervation des *c2*-Muskels.

(6) Wie Elektromyogramme freilaufender Spinnen zeigen, besteht das Körperanhebeverhalten aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen: einer *lokalen c2*-Kontraktion im taktile gereizten Bein, die eine Bewegung im zugehörigen Prosoma-Coxa-Gelenk verursacht, und einer durch diese aktive Bewegung hervorgerufenen *plurisegmentalen* Reaktion im *c2* der übrigen 7 Beine. Wird eine Coxa passiv bewegt, kann auch in festgelegten Spinnen eine plurisegmentale Reaktion aller 8 Beine ausgelöst werden.

(7) Sowohl bei der lokalen als auch bei der plurisegmentalen Reaktion des „Körperanhebens“ rekrutiert *c2* die gleichen neuromuskulären Einheiten. Dies deutet auf die gleiche zentralnervöse Endstrecke beider Reaktionen hin. Die Anzahl der elektrophysiologisch unterscheidbaren neuromuskulären Einheiten stimmt mit der anatomisch nachgewiesenen Motoneuronen und Fasertypen überein.

(8) Der tergale *c2*-Anteil ist immer, der apodemale Anteil nur bei schnellem Körperanheben, schnellen Laufstarts und bei Schreckreaktionen (Flucht) der Spinne aktiv. Hierbei rekrutiert der apodemale Teil nur zu Beginn der Verhaltensweise schnelle phasische Einheiten.

(9) Ich diskutiere bei welchen Bewegungsweisen der Spinne die 4 Fasertypen vermeintlich zum Einsatz kommen, wie sie höchstwahrscheinlich innerviert werden und welche Konsequenzen die *c2*-Zweiteilung in den vorderen Beinpaaren (1–3) auf die Beinbewegung im Verhalten haben könnte. Am wahrscheinlichsten ist eine verstärkte Druckerhöhung zur Beinextension durch schnelle anfängliche Kontraktionen des „apodemalen Hebels“ und eine vektorielle Kräfteaddition der zwei Muskelteile.

(10) Anhang II behandelt den internen Gelenkrezeptor R_0 im Prosoma-Coxa-Gelenk. Ausschaltversuche weisen R_0 als unentbehrlich für das Zustandekommen der plurisegmentalen Reaktion aus. Lage und Anordnung der R_0 -Sinneszellen sind in den Beinpaaren 1–3 und den Hinterbeinen verschieden.

Einleitung

Die Muskulatur von Arthropoden baut sich heterogen aus Fasertypen unterschiedlicher Eigenschaften auf (Rathmayer 2000). Einzelne Muskelfasern werden von mehreren erregenden und hemmenden Motoneuronen (*polyneural*) innerviert. Die motorischen Axone bilden entlang der Muskelfaser viele Synapsen (*multiterminal*) aus. Dies steht ganz im Gegensatz zu den Skelettmuskeln der Vertebraten, die sich homogen aus Zuckungsfasern ähnlicher Eigenschaften zusammensetzen. Die einzelne Muskelfaser wird hier nur von einem Motoneuron innerviert. Die Erregungsübertragung vom terminalen Motoaxon erfolgt bei Vertebraten meist nur über eine oder wenige Synapsen und ist ausschließlich erregender Natur.

Untersuchungen der Beinmuskulatur von Spinnen (Maier, Root und Seyfarth 1987), Krebsen (Rathmayer und Maier 1987; Günzel, Galler, und Rathmayer 1993) und Insekten (Müller et al. 1992), ergaben eine heterogene Zusammensetzung aus mehreren Muskelfasertypen, die sich anatomisch (Sarkomerlänge) und histochemisch (Enzymaktivitäten) voneinander unterscheiden. Gemeinsam mit dem mechanischen und elektrischen Antwortverhalten einzelner typisierter Muskelfasern lassen diese Daten mögliche funktionelle Rückschlüsse auf verschiedene Kontraktionsmodi und Stoffwechselwege bei Bewegungsabläufen der Tiere zu.

Eine Typcharakterisierung von Muskelfasern wird auch nach deren spezifischen Proteinzusammensetzung vorgenommen. Gelelektrophoretische Untersuchungen histochemisch identifizierter Muskelfasern bei Crustaceen zeigen, dass mehrere Varianten einzelner Proteine, so genannte Isoformen, fasertyp-spezifisch verteilt sind und als verlässlicher „Fingerabdruck“ für den jeweiligen Fasertyp dienen können (Mykles 1988).

Zur Muskulatur speziell bei Spinnen gibt es nur wenige Untersuchungen. Genauere Kenntnisse darüber sind aber aus mehreren Gründen interessant. Spinnen haben mit ihren 8 Beinen einen äußerst hohen Grad an Komplexität und Plastizität ihrer Bewegungsweisen erreicht (Beinkoordination beim Laufen, Orientierung am Faden, Netzbau). Desweiteren hat

die ausgeprägte Mitochondrienarmut ihrer Muskelzellen eine eigenartige Laufphysiologie zur Folge, die in der Literatur als „locomotory collapse“ bezeichnet wird (Linzen und Gallowitz 1975): Spinnen bewegen sich zwar kurzzeitig sehr schnell, halten jedoch schon nach kurzen Laufstrecken ermüdet inne. Zu guter Letzt zeigen Beine von Spinnen noch die Besonderheit, dass ihnen an mehreren Gelenken Streckermuskeln fehlen. Diese Gelenke werden allein über eine Erhöhung des Hämolympdruckes gestreckt, also indirekt und hydraulisch.

Für die vorliegende Arbeit untersuchte ich den Muskel *c2* der mittelamerikanischen Jagdspinne *Cupiennius salei* Keys. (Ctenidae). Der *c2*-Muskel wird von Palmgren (1980) in seiner vergleichenden Muskelanatomie funktionell als der anteriore Levator der Coxa angesprochen. Interessant an *c2* ist seine regelmäßige Aktivität an einem einfachen reflektorischen Verhalten, das die Spinne sowohl in freier Natur als auch auf einer Styroporkugel im Labor zeigt: Werden ventrale coxale Tasthaare durch Berührung gereizt, bewegt die Spinne nach ca. 120–160 ms ihren Körper ruckartig nach oben (Eckweiler und Seyfarth 1988; Kadel 1992). Die Spinne vermeidet durch die Einstellung einer neuen Körperhöhe einen weiteren Zusammenstoß mit Hindernissen, die sie verletzen könnten. Das eigentliche Körperanheben folgt einem abgestimmten und nahezu zeitgleichen Strecken aller 8 Beine. Hinter der Beinstreckung steht das plurisegmentale Zusammenspiel der Aktivität (d. h. Kontraktionen) mehrerer Beinmuskeln, innerhalb derer *c2* mit der kürzesten Latenz reagiert. Wie Elektromyogramableitungen zeigen, resultiert das Körperanheben aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Primär erfolgt eine *lokale Reaktion* im *c2* des gereizten Beins. Diese bewirkt eine Bewegung im betreffenden Prosoma-Coxa-Gelenk, welche dann sekundär die *plurisegmentale Reaktion* der *c2*-Muskeln der übrigen 7 Beine nach sich zieht.

Angesichts dieser Erkenntnisse ergeben sich für folgende Bereiche mehrere Fragen:

Muskelanatomie: Wie ist der *c2*-Muskel im Spinnenkörper angeordnet? Lassen sich histochemisch verschiedene Fasertypen unterscheiden? Wenn ja, wie verhalten sich deren Sarkomerlänge und Proteinzusammensetzung zueinander? Welche Schlussfolgerungen auf

den Kontraktionsmodus lassen sich aus diesen Ergebnissen ziehen?

Muskelinnervation: Wie wird der *c2*-Muskel innerviert? Gibt es dabei Hinweise auf eine hemmende Innervation durch GABA-erge Neurone?

Muskelaktivität: Welcher Reiz führt selbst bei festgelegten Spinnen (auf einem Halter) zu einer plurisegmentalen Muskelantwort? (Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine gezieltere Tasthaarreizung und Ableitungen von *c2*-Muskeln mehrerer Beine.) Rekrutiert *c2* die gleichen neuromuskulären Einheiten in beiden Reaktionen des Körperanhebeverhaltens? Bei welchen weiteren Bewegungsweisen ist *c2* noch aktiv?

Propriorezeptoren beim Körperanheben: Welches Sinnesorgan perzipiert die durch die lokale Reaktion ausgelöste Bewegung im Prosoma-Coxa-Gelenk? Wo liegt es und wie ist es aufgebaut?

In der vorliegenden Arbeit zeige ich, dass der *c2*-Muskel in den vorderen Beinpaaren 1–3 zweiteilig (apodemaler- und tergaler Anteil) und in den Hinterbeinen einteilig aufgebaut ist (nur tergaler Anteil). Durch histo- und biochemische Methoden weise ich nach, dass sich der *c2*-Muskel *heterogen* aus vier verschiedenen Fasertypen zusammensetzt (A-, B-, C-, D-Fasern), die sich in ihren anatomischen Abmessungen sowie in ihrer Enzym- und Proteinausstattung unterscheiden. Laseroptische Methoden belegen für diese Fasertypen signifikant unterschiedliche Sarkomerlängen. Demnach kontrahieren A- und B- Fasern schneller als C- und D-Fasern. Selektive Anfärbungen des *c2*-Nerven aller Beine dokumentieren eine *polyneurale c2*-Innervation. Zwei Motoneurone sind GABA-immunreaktiv. Elektromyogramme des *c2*-Muskels zeigen, dass für die plurisegmentale Reaktion in festgelegten Spinnen ein passiver Bewegungsreiz auf die Coxa nötig ist. Sowohl bei der lokalen als auch bei der plurisegmentalen Reaktion rekrutiert *c2* die gleichen neuromuskulären Einheiten, was gleiche zentralnervöse Verschaltungswege nahelegt.

In der Diskussion schlussfolgere ich für Fasertyp A und B schnelle, phasische und für Typ C und D langsame, tonische Kontraktionen bei jeweils spezifischen Bewegungsweisen der

Spinne. In einem Anhang werden Details eines internen Gelenkrezeptors (R_0) behandelt, der die Bewegung des Prosoma-Coxa-Gelenkes perzipiert.

Einige vorläufige Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits als Abstracts veröffentlicht worden (Kadel, Bickeböller und Seyfarth 1989; Bickeböller, Galler und Seyfarth 1989; Bickeböller, Kadel und Seyfarth 1991).

Material und Methoden

I. Versuchstiere

Für sämtliche Untersuchungen verwendete ich adulte Weibchen (9–10 Monate nach dem Schlupf; diagonale Beinspannbreite von ca. 10–12 cm) der mittelamerikanischen Jagdspinne *Cupiennius salei* (Keyserling 1877) (Ctenidae) aus der Zucht unserer Arbeitsgruppe am Zoologischen Institut in Frankfurt am Main. Informationen zur Laborhaltung und zu den Zuchtbedingungen können der Veröffentlichung von Höger und Seyfarth (1995) entnommen werden. Die Spinne *C. salei* baut keine Netze, sondern fängt ihre Beute im natürlichen Habitat am Boden oder auf Pflanzensubstrat lauernd. Details zur allgemeinen Biologie und systematischen Einordnung der Art sind in Barth (2001) zusammengefasst.

II. Präparationen zur Muskelanatomie

Die Präparationen zur Lage und Anordnung des *c2*-Muskels wurden an alkoholfixierten Spinnen (70 % Ethanol) in mit Sylgard ausgegossenen Petrischalen unter dem Binokular mit Zeichenspiegel durchgeführt. Teilweise machte eine zusätzliche Oberflächenfärbung der Muskelansätze mit 0,02 % Janusgrün-B die Verhältnisse noch deutlicher (Yack 1993). Ein solches Färberesultat ist in **Abb. 2a** zu sehen.

III. Fasertypisierung durch histochemische Nachweise

Um im *c2*-Muskel zwischen Faserpopulationen mit unterschiedlichem Stoffwechsel und Kontraktionsmodus unterscheiden zu können, wurden seine Fasern hinsichtlich ihres Glykogengehaltes und ihrer myofibrillären Adenosintriphosphatase (ATPase)- und Succinat-

(Bernsteinsäure) dehydrogenase (SDH) -Aktivität untersucht. Bei dieser Technik ist durch Färbung eine Lokalisierung des durch eine chemische Reaktion erkannten Stoffes möglich und mikroskopisch erkennbar. Die Färbeintensität lässt sich klassifizieren und durch eine chemische Reaktionsgleichung charakterisieren. Bei der enzymhistochemischen Technik werden nicht etwa die geringen Enzymmengen im Gewebe nachgewiesen, sondern vielmehr ihre Aktivitäten; das spezifische Substrat wird angeboten und das Umsetzungsprodukt optisch sichtbar gemacht. Voraussetzung für eine Enzymaktivität ist natives Gewebe, weshalb die Nachweise jeweils an frischen Gefrierschnitten stattfanden.

Prosomen wurden in schmelzendem Isopentan unter flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefriermikrotom (2800 Frigocut; Fa. Reichert und Jung) mit einer vorgekühlten Rasierklinge geviertelt. Diese Präparate wurden auf Objekthalter aufgebracht und mit Tissue-Tec umhüllt. Anschließend wurden 21 µm dünne Gefrier-Serienquerschnitte bei -20°C auf beschichtete Deckgläschen aufgenommen. Nach einem 10-minütigen Trocknungsprozess (auf einer Wärmeplatte bei 30°C) wurden benachbarte Schnitte den folgenden Nachweisreaktionen ausgesetzt:

Nachweis von SDH-Aktivität: SDH ist ein Enzym des in den Mitochondrien stattfindenden Citratzyklus. Dieses substratspezifische Enzym steuert die reversible Oxidation von Bernsteinsäure zu Fumarsäure. Es ist ein Maß für die oxidative Kapazität der Zelle und gleichzeitig ein Mitochondrienmarker. Die Bestimmung der SDH-Aktivität erfolgte nach einer abgewandelten Methode von Nolte und Pette (1972). Das Prinzip der Enzymreaktion besteht in einer Oxidation von Succinat mit einer gekoppelten Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium. Die Intensität des sich hierbei niederschlagenden Formazans ist ein Maß für die Enzymaktivität. **Abbildungen 4b** und **5b** zeigen die resultierende Blaufärbung im Gefrierschnitt. Kaliumcyanid im Reaktionsmedium entkoppelt die Atmungskette (Inaktivierung der Cytochromoxidase) und erhöht und beschleunigt die farbstoffreduzierende

Aktivität. Phenazinmethosulfat dient als Wasserstoff-Akzeptor (übernimmt H_2 vom Flavoprotein der SDH) und Elektronenüberträger. Kontrollen fanden ohne das Substrat Succinat statt.

FrISChe Gefrierschnitte wurden für 20 min (im Wärmeschränk bei 37°C) in der Reaktionslösung inkubiert (siehe detailliert im gesonderten Methodenanhang am Ende der Arbeit), anschließend mit Puffer gespült, 10 min in Formalin fixiert, entwässert und über Xylol in Permount eingebettet.

Nachweis myofibrillärer ATPase-Aktivität: Die Bestimmung der myofibrillären ATPase-Aktivität erfolgte nach einem modifizierten Prinzip von Padykula und Herman (1955) und Maier, Root und Seyfarth (1987). Die an Aktomyosin gebundene ATPase spaltet das für den Kontraktionsmechanismus der Muskelfasern energieliefernde ATP. Die ATPase-Aktivität korreliert direkt mit der Kontraktionsgeschwindigkeit (Bárány 1967). Hierbei wird das durch die ATPase abgespaltene freie anorganische Phosphat in unlösliches Calciumphosphat überführt und gefällt. Zusammen mit Kobaltchlorid bildet es Kobaltphosphat. Die Intensität des sich nach Umsetzung mit Ammoniumsulfid niederschlagenden Kobaltsulfids ist ein Maß für die Enzymaktivität. (Lösungen und Färbeprozedur siehe Anhang AI). **Abbildungen 4c** und **5c** zeigen die resultierenden gräulich bis schwarzen Farbnuancen im Gefrierschnitt. Kontrollfärbungen fanden ohne ATP in der Reaktionslösung statt.

Mit dem zusätzlichen Verfahren der Typisierung durch Vorinkubation der Schnitte bei unterschiedlichem pH wurden eventuell vorhandene verschiedene ATPase-Isoenzyme auf ihre pH-Labilität bzw. -Stabilität getestet (Brooke und Kaiser 1970). Es können dadurch Subpopulationen innerhalb der hochaktiven bzw. schnell kontrahierenden Fasern identifiziert werden.

Nachweis von Glykogengehalt: Glykogen ist ein Reserve-Kohlenhydrat der Spinne, dessen Nachweis Aussagen über den glykolytischen Stoffwechsel der *c2*-Muskelfasern zulässt. Indirekt erfährt man auch etwas über die Kontraktibilität der Muskelfasern; wenig Glykogen bedeutet relativ rasches Ermüden und damit keine langanhaltenden Kontraktionen. Viel Glykogen ermöglicht der Faser eine ausdauernde Beteiligung an Bewegungsabläufen. Der Glykogengehalt wurde mit der PAS („Periodic-acid-Schiff“-)Reaktion bestimmt (Romeis 1968). Die PAS-Reaktion beruht auf einer durch Perjodsäure verursachten Oxidation von im Muskelquerschnitt vorhandenen 1, 2-Glykolgruppen in Dialdehyde. Schiff'sches Reagenz (Leukofuchsin oder fuchsinschweflige Säure) wird bereits durch Spuren von Aldehyden rosa bis violettrot gefärbt. Die Intensität der Färbung ist ein Maß für den Glykogengehalt im Muskel. Beispiele für die positive Glykogen-Färbung sind in den **Abb. 4a, 5a** zu sehen. Als Kontrollen diente zum einen die Färbeprozedur ohne Oxidation und zum anderen eine Inkubation für 2 Stunden in einer frisch angesetzten 1 % Diastaselösung vor der Oxidation. Diastase ist ein der im Speichel vorhandenen α -Amylase verwandtes Enzym, das Glykogen zu spalten vermag.

Histologische Auswertung: Die fertigen Gefrierschnitte wurden zur weiteren Auswertung unter dem Mikroskop fotografiert, verglichen und gezeichnet. An den Zeichnungen fand die Ermittlung des minimalen und maximalen Querschnittes und der Anschnittfläche einer jeden Faser des *c2*-Muskels mit einem grafischen Tablett (MOP-AM03 Digiplan, Fa. Kontron Messgeräte GmbH, München) statt. Die relative Intensität aller 3 Nachweise in den Gefrierschnitten wurde mit Stufen von 0 (keine Aktivität), 1 (1–25 %), 2 (25–50 %), 3 (50–75 %) und 4 (75–100 %) klassifiziert (Hart und Fournier 1979). Eine Zusammenfassung hierzu zeigen die beiden **Tabellen 1 und 2** im Ergebnisteil.

IV. Sarkomerlängenmessungen mit Laserlicht

Um Informationen über die Kontraktionsgeschwindigkeit einzelner typisierter Muskelfasern zu erhalten, wurde deren Sarkomerlänge gemessen. Je kürzer diese ist, umso schneller kontrahiert die Faser (Jahromi und Atwood 1969).

Gefriertrocknung: Um die histochemisch typisierten Fasern aus dem Verband des *c2*-Muskels zu gewinnen, musste dieser zunächst gefriergetrocknet werden. Bei betäubten adulten Tieren wurde das Prosoma vom Abdomen getrennt, das Tergum rasiert, und die Palpen und die Cheliceren abgeschnitten. Danach folgte die Gefriertrocknung. Als Zwischenmedium bzw. Kühlmittel für das Gewebe diente für einige Minuten schmelzendes Isopentan (-80°C), welches zuvor mit flüssigem Stickstoff zum Frieren gebracht worden war. Isopentan verhindert die Bildung von Eiskristallen und das Anfrieren des Gewebes bei Kontakten mit der Gefäßwandung oder dem Präparationsbesteck. Anschließend kam das Gewebe für 5 min in flüssigen Stickstoff (-196°C). Danach viertelte ich das Prosoma mit einer vorgekühlten Rasierklinge im Cryostaten bei -30°C und trennte die Beine am Coxa-Trochanter-Gelenk ab. Anschließend lagerte das Gewebe 4–5 Wochen bis zu seiner vollständigen Trocknung in einer Tiefkühltruhe bei -28°C in einem luftdichten Gefäß auf Kieselgel (blau), das in regelmäßigen Zeitabschnitten kontrolliert und bei Rosafärbung ausgetauscht wurde. Bei dem Trocknungsprozess verfärbt sich der Muskel und jede einzelne Faser von anfangs elfenbeinfarben bis zu strahlendem Weiß.

Faserisolierung: Aus den vollständig getrockneten Prosomavierteln wurde der *c2*-Muskel vorsichtig herauspräpariert. Die weitere Auftrennung in einzelne Fasern erfolgte unter dem Stereomikroskop mit Pinzette und hauchdünn ausgezogenen Glaskapillaren. Als Orientierungshilfe diente mir hierbei die histochemische Kartierung des *c2*-Muskels mit der Lage der einzelnen Muskelfasertypen. Der schematische Querschnitt des *c2*-Muskels in den **Abb. 4**

und 5 zeigt jeweils diese „Landkarte“ für das Vorder- und Hinterbein. Die isolierten, identifizierten Fasern lagerten bis zum Zeitpunkt der Sarkomerlängenmessung in Gelatine kapseln (Apothekerbedarf) auf Trockenmittel im Gefrierschrank.

Sarkomerlängenmessung mit Laserlicht. Der Sarkomerlängenmessung lag die Methode der Laserdiffraktometrie zugrunde (Zite-Ferenczi und Rüdel 1978; Zite-Ferenczi et al. 1986). Hierbei wirkt die Querstreifung der Muskelfaser als optisches Gitter. Das durch die Muskelfaser fallende kohärente Laserlicht (632,8 nm; 4 mWatt) wird an den regelmäßig angeordneten optisch dichteren und weniger dichten Strukturen der Muskelfaser gebeugt. Unter der Muskelfaser entsteht ein Interferenzmuster (Beugungsgitter) aus mehreren Interferenzmaxima und -minima. Aus dem Abstand der Maxima, der Strecke Muskelfaser-Interferenzmuster, dem Beugungswinkel und der Wellenlänge des verwendeten Lichts errechnet sich mit einer Formel (= Bragg'sches Gesetz) die Gitterkonstante, die der Sarkomerlänge der durchstrahlten Faser entspricht. Für die Messungen klebte ich isolierte, gefriergetrocknete Fasern mit Nitrozellulose einzeln an zwei an einer Halterung fixierte Glasnadeln an. Hierdurch wurde die ursprüngliche Faserlänge auch während der Messung, bei der die Faser in relaxierende Lösung getaucht wurde, beibehalten.

V. Proteinanalyse typisierter Muskelfasern mit SDS-Gelelektrophorese

Um festzustellen, ob sich bestimmte Muskelfasertypen durch charakteristische Proteine bzw. Polypeptide auszeichnen, bot sich deren Auftrennung und Darstellung durch die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) an (Laemmli 1970).

Prinzip der SDS-Gelelektrophorese: SDS bindet als anionisches Detergens an hydrophobe Proteinregionen und löst die Tertiärstruktur der Proteine auf. Die Auftrennung der dissoziier-

ten Untereinheiten auf einem Gel erfolgt linear zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Die Gele bestanden aus Acrylamid- und N,N-Methylen-Bisacrylamid-Polymeren, wobei erstgenanntes zu langen Ketten polymerisiert, die von letztgenanntem quervernetzt werden. Der Vernetzungsgrad im Gel und das Molekulargewicht des jeweiligen Proteins beeinflussen die Laufgeschwindigkeit der Proteine. Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels. Es wurden 10 %- und 15 % ige Trenngele und jeweils 5 % ige Sammelgele verwendet. Der Vernetzungsgrad dieser Gele eignet sich bevorzugt für eine Untersuchung der Proteine mit mittlerem und niedrigem Molekulargewicht. Als Proteinstandards wurden *Rainbow low* und *high* der Firma Biometra[®] und *Standard IV* und *VIII* von Merck[®] verwendet.

Zusammensetzung der Proben: Die Proben bestanden aus in SDS-Puffer (Rezept siehe Anhang AI. 2.) gelösten, einzelnen Muskelfasern, die ich zuvor im gefriergetrockneten Zustand entsprechend ihrer histochemischen Typzugehörigkeit präparierte. Jodoacetamid (JAA) und Dithiothreitol (DTT) in den Proben verhinderten die Rekonstituierung von Disulfidgruppen zwischen den dissoziierten Proteinuntereinheiten. Sogenannte D-Fasern stellen im zentralen Bündel des *c2*-Muskels zahlenmäßig die Minderheit dar (nur 9 Fasern). Aus diesem Grunde, und weil sie sich in der Sarkomerlänge nicht signifikant von den C-Fasern unterscheiden, kamen sie nur als gemeinsame Faserfraktion mit den C-Fasern zur Verwendung (C/D). Die Proben A, B, C und C/D stammten aus den *c2*-Muskeln der Hinterbeine eines Tieres. Die Proben A_{apo}, A_{terg}, A₁, A₄, C/D₁ und C/D₄ waren jeweils aus den *c2*-Muskeln der Hinter- und Vorderbeine zweier Schwestertiere zusammengesetzt (= „gepoolt“, genaue Probenbeschreibung siehe Anhang AI. 2.).

Insgesamt wurden 8 Gele mit dem Biometra[®] Minigelsystem für Flachbettgele angefertigt. In Gel 7 und 8 wurde eine Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (1973; s. u.) vorgenommen und pro Slot 40 µg bzw. 20 µg Protein geladen. Diese beiden Fälle sind in **Abb. 8** und **9** zu sehen. In den sechs weiteren Fällen entsprachen die geschätzten, geladenen

Proteinmengen bei Typ A und B je 2 Fasern und bei Typ C und C/D je 6 Fasern (A- und B-Fasern sind ungefähr dreimal so lang wie C- und D-Fasern).

Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (1973): Um nicht nur geschätzte Proteinmengen (Zahl an Fasern) zu laden, fand eine Proteinbestimmung statt. Die Probenproteine wurden in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und mit einer Millipore-Filteranlage an Nitrocellulosefilter gebunden. Auf diesen wurden sie mit Amidoschwarz 10B gefärbt und anschließend mehrfach entfärbt, so dass nur an Protein gebundenes Amidoschwarz darauf verblieb. Der Farbstoff wurde mit einer Elutionslösung extrahiert und die Absorption bei 630 nm fotometrisch bestimmt. Parallel dazu erfolgte die gleiche Prozedur mit Standard-Proben (Bovine Serum Albumin, BSA) für eine Eichkurve. Die Färbung korreliert linear mit der Proteinkonzentration. Letzlich wurden 20 µg Protein pro slot bzw. Fasertyp geladen.

Elektrophorese: Die Gele wurden in eine Elektrophoresekommer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach dem Entfernen der Gelkämme aus dem Sammelgel wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde nach dem Laden der Proben für 5 min mit einer Stromstärke von 5 mA, anschließend bis zum Erreichen des Trenngels mit 15 mA und dann bis zum Ende mit 25 mA durchgeführt. Die gesamte Laufzeit betrug ca. 1,5 h.

Fixierung und Färbung: Die mit SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in den Gelen mit 10 % Glutaraldehyd fixiert und mit Silber- oder Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-R 250 gefärbt. Bei der Silberfärbung beruht die Sichtbarmachung der Proteine im Gel auf einer Komplexbildung der Proteine mit Silberionen und einer anschließenden Reduktion zu metallischem Silber mit Formaldehyd im sauren Milieu.

Gelwertung: Nach der Färbung wurden die Gele im Durchlicht eines Leuchttisches fotografiert (Pan F Ilford und Agfa Ortho). Anschließend kamen sie zur Trocknung und zur Einschweißung in einen Vakuumtrockner. Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteinbanden erfolgte nach der Methode von Weber und Osborn (1969). Nachdem die Länge des Trenngels und die zurückgelegte Wegstrecke des jeweiligen Standard-Polypeptids ermittelt waren, konnte für jedes Standard-Polypeptid der sogenannte *Retentionsfaktor* R_f bestimmt werden. Er ist der Quotient aus der Wegstrecke des Proteins in mm und der Länge des Trenngels in mm. R_f wurde gegen den natürlichen Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. Durch die Verbindung der gewonnenen Punkte der Standard-Proteine erhielt ich eine Eichkurve, mit der über den R_f -Wert der unbekannten Faser-Proteine durch Interpolation deren molekulare Masse ermittelt werden konnte. Zur optischen Darstellung wurden die Negative der Gele über einen Scanner digitalisiert, zum Positiv konvertiert und mit Photoshop (Version 5) arrangiert und beschriftet.

Benennung myofibrillärer Proteine des c2-Muskels: Durch den konsequenten Vergleich der erhaltenen molekularen Massen der Faser-Proteine mit Werten aus der Literatur (z. B. die Datenbanken NCBI, PubMed = <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und Protein Data Bank = <http://www.rcsb.org>), konnte ich die jeweiligen Banden im Gel als die mit großer Wahrscheinlichkeit zutreffenden Protein-„Kandidaten“ ansprechen. Die Numerierung der Isoformen erfolgte vom höher- zum niedermolekularen Massenbereich mit der Anzahl des Auftretens der entsprechenden Banden. In keinem Fall wurde eine Myosinaufreinigung oder eine positive Proteinidentifizierung mit spezifischen Antikörpern vorgenommen.

VI. Darstellung der *c2*-Motoneurone durch „Backfills“

Um Anzahl und Lage der den *c2*-Muskel innervierenden Motoneuronen im Zentralnervensystem (ZNS) der Spinne festzustellen, wurden sogenannte „Backfills“ des *c2*-Nerven mit verschiedenen Tracersubstanzen durchgeführt.

Prinzip der Backfills: Hierbei werden die Motoneuronen primär mit Tracern (NiCl_2 , CoCl_2 , CoLysin) gefüllt, deren Salze dann sekundär als farbliche Niederschläge nachweisbar sind. Die Ionen wandern auch im unmittelbar abgetöteten Tier entlang der Nervenfasern aus der Peripherie bis in die feinsten Endigungen im ZNS. Wahrscheinlich liegt dieser Migration ein aktiver Transport zugrunde (Mücke und Lakes 1988).

Präparieren und Füllen: Präpariert wurde in mit Sylgard (Härter : Binder = 1:10) ausgegossenen Petrischalen. Bei der CO_2 -betäubten Spinne wurde das Abdomen abgetrennt und das Prosoma mit Wachs verschlossen. Nach einem Einschnitt in die gespannte Intersegmentalhaut zwischen den Coxen zweier hintereinanderliegenden Beinen, wurde der *c2*-Muskel samt Nerv freigelegt. Anschließend konnte er an seinem Ursprung und Ansatz abgetrennt und „zur Seite geklappt“ werden. An seiner ursprünglichen Stelle wurde ein Vaselinetöpfchen gebaut, in das ich den Muskelstumpf samt Nerv überführte. Darin erfolgte die Durchtrennung des Nerven unter Aqua dest.. Nach einem einminütigen Quellvorgang wurde die wässrige Lösung mit der entsprechenden 5 % igen Tracerlösung (CoCl_2 , NiCl_2 oder Colysin) ausgetauscht, das Töpfchen mit Vaseline verschlossen und das Präparat über Nacht bei 3°C im Kühlschrank aufbewahrt (siehe auch Seyfarth, Eckweiler und Hammer 1985).

Fällen und fixieren: Nach einer Laufzeit von mindestens 14 h und maximal 24 h (bei 4°C) erfolgte zunächst die Fällung (Quicke und Brace 1979; Altman und Tyrer 1980). Hierzu wurde das Vaselinetöpfchen geöffnet, das Präparat mit Ringer gespült und zunächst in situ

gefällt: bei NiCl_2 mit 3 Tropfen einer Dithiooxamid (Rubeanwasserstoff)-Lösung und bei CoCl_2 und CoLysin entsprechend mit frischer Ammoniumsulfid-Lösung. Wegen des entweichenden Schwefelwasserstoffs fanden diese Schritte unter einem Abzug statt. Färbte sich der Nervenstumpf blau bzw. schwarz, kamen die Präparate noch zweimal für je 20 min in Fällungslösung. Nach fünfminütigem Spülen in Puffer schloss sich die Fixierung in 4 % Formaldehyd (für NiCl_2), bzw. Bouin-Lösung (für CoCl_2 und CoLysin) für 3 Tage an.

Intensivieren, Einbetten und Auswerten: Für die anschließende Intensivierung mit Silbernitratlösung (Bacon und Altman 1977) wurde das ZNS herauspräpariert und noch einmal über Nacht nachfixiert. Nach der Entwässerung konnten die Präparate in Epoxidharz (Araldit) eingebettet und am Mikrotom geschnitten werden. Die Rekonstruktionen der Projektionen der Motoneuronen fanden an 30 μm dünnen Horizontal- und Sagittalschnitten mit Hilfe eines Mikroskopes mit Zeichenspiegel statt.

Biocytinfärbung: Biocytin wählten wir als ungiftigen Vergleich zu den Schwermetall-Backfills. Es handelt sich um ein Konjugat aus Biotin und Lysin. Das Molekulargewicht von Biocytin ist äußerst gering ($\text{MG} = 372$), liegt damit unter dem von konventionellen Tracern (Huang, Zhou und DiFiglia 1992), und kann dadurch leichter aufgenommen und schneller transportiert werden (Schäfer 1991). Da es eine hohe Bindungsaktivität zu Avidin besitzt, wird es mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Lösung) im Gewebe nachgewiesen.

Die Präparation fand wie unter „Präparieren und Füllen“ beschrieben, nur mit einer 4 % Biocytin-Lösung statt. Der Weiterführung der Präparate lag eine Verfahrensweise von Manfred Schmidt (persönliche Mitteilung) an Crustaceen zugrunde, welche wiederum auf der Methode von Horikawa und Armstrong (1988) beruht. Die Einbettung des ZNS erfolgte in Gelatine und die Inkubation mit ABC-Lösung an 100- μm -Vibratomschnitten.

VII. GABA-Immuncytochemie

Um eine vermeindlich über GABA vermittelte periphere inhibitorische Innervation des *c2*-Muskels zu überprüfen, wurden Semidünnschnitte des *c2*-Nerven in Nähe des Muskels auf GABA-ähnliche Immunreaktivität hin untersucht.

Präparation: Zunächst fand eine 10-minütige in-situ-Vorfixierung des ZNS mit GPA-Fixativ statt. Danach wurde das ZNS herauspräpariert und über Nacht bei 4°C in Fixierlösung überführt. Es folgte die Einbettung in Paraplast (oder Agarose) und die Anfertigung der Schnitte am Mikrotom oder Vibratom. Der Immuncytochemie lag die Vorgehensweise von Fabian-Fine (1999) am Spaltsinnesorgan VS-3 von *C. salei* zugrunde. Die gesamte Färbeprozedur ist detailliert im Anhang AI. 4. beschrieben.

VIII. Elektromyogramme

Um die Aktivierung des *c2*-Muskels in verschiedenen Verhaltenssituationen zu bestimmen, wurden Elektromyogramme mit feinen Drahtelektroden abgeleitet. Simultane Registrierungen der Aktivität von *c2*-Muskeln in mehreren Beinen ermöglichten es, ihren zeitlichen Einsatz genau zu bestimmen. Darüber hinaus war es möglich, bei starker zeitlicher Dehnung der aufgezeichneten Signale einzelne motorische Einheiten an ihrer Amplitude und an ihrem Zeitverlauf zu identifizieren.

Ableitung der Muskelpotentiale: Unter CO₂-Betäubung wurden die cuticularen Haare über dem Muskelursprung am Tergum entfernt. Mit einer Minutiennadel wurden vorsichtig zwei kleine Löcher so weit in das Tergum gebohrt, bis die darunterliegende Hypodermis erreicht war. Anschließend wurden zwei an den Spitzen abisolierte Kupferdrähte (Durchmesser 50 µm) als Ableitelektroden durch die Hypodermis in den jeweiligen Muskelursprung

implantiert und mit Acrylkleber an der umgebenden Cuticula festgeklebt. Zusätzlich wurde noch eine Referenzelektrode, ebenfalls aus Kupferdraht (150 μm stark), durch die weiche Cuticula des dorso-lateralen Abdomens flach in die darunter befindliche Hämolymphe eingestochen und an der Cuticula festgeklebt. Die abgeleiteten Muskelpotentiale wurden differentiell verstärkt (Faktor 500), auf einem Speicheroszillographen sichtbar gemacht und auf einem analogen Magnetbandgerät gespeichert.

Zwei Versuchssituationen

1.) *Versuchssituation „festgelegte Spinne“ auf einem Halter:* Um bestimmte Tasthaare kontrolliert reizen und gleichzeitig die Aktivität mehrerer *c2*-Muskeln messen zu können, wurden die zuvor betäubten Spinnen auf einen justierbaren Plexiglashalter mit dünnen Klebestreifen und Bienenwachs „rücklings“, mit dem Sternum nach oben, festgelegt. Die Ableitelektroden ließen sich über eine Öffnung in der Plexiglasscheibe in die tergalen *c2*-Ursprünge implantieren. Diese Versuchsanordnung diente primär dem Ziel, herauszufinden, welche Reizbedingungen eine *plurisegmentale Reaktion* in allen 8 Beinen auslösen. Das heißt, das eigentliche Körperanheben bleibt bei dieser Versuchsanordnung aus, es wird allein auf die Muskelantwort in mehreren *c2*-Muskeln „reduziert“.

Reizgebung: Bei den festgelegten Spinnen auf dem Halter wurden ca. 5–10 ventrale Coxahaare mit einer ausgezogenen Glaskapillare ausgelenkt. Um den Reizbeginn klar zu definieren, war die Kapillare an den Wippkontakt eines elektrischen Tasters gekoppelt. Das mit der Auslenkung der Haare entstandene elektrische Signal wurde als Reizbeginn gemeinsam mit den Elektromyogrammen (Muskelpotentialen) auf Magnetband aufgezeichnet.

2.) *Versuchssituation „frei bewegliche Spinne“ auf einer Kugel:* Es wurde die von Seyfarth (1985) beschriebene Kugelapparatur verwendet. Es handelt sich dabei um eine Anordnung, in der eine ausgehöhlte Styroporkugel (25 cm Durchmesser, 25 g Gewicht) auf einem von unten

in eine Kunststoffschale eingeleiteten Luftstrom freischwebend und drehbar gelagert ist. Das Schema in **Abb. 15** zeigt diese Apparatur. Die Kugel ermöglicht es, bei *C. salei* unter kontrollierten Bedingungen ein dem „natürlichen“ Körperanheben weitgehend entsprechendes Verhalten auszulösen und gleichzeitig die Muskelaktivität der *c2*-Muskeln mehrerer Beine und die Veränderung der Körperhöhe zu messen.

Versuchsvorbereitungen: Die Versuchstiere wurden zunächst betäubt und mit einem kleinen tergalen Halter versehen. Dieser bestand aus einem mobilen, freidrehbaren Metallstift, der über einen reißfesten Zwirn mit einem kleinen Stück Pappe in Verbindung stand. Letzteres wurde mit Wachs auf dem rasierten Tergum, dorsal auf der Spinne befestigt. Um Reaktionen auf optische Reize auszuschalten, wurden die Spinnenaugen mit schwarzem Lack geblendet.

Versuchsdurchführung. Das Versuchstier wurde mit dem Halter, wie in **Abb. 15a** dargestellt, an einem Stativ befestigt. Unter diesen Bedingungen lassen sich vom Experimentator gezielt einzelne Tasthaare mit einer dünnen Glaskapillare reizen. Die nach Reizung erfolgende Veränderung und Neueinstellung der Körperhöhe wurde durch einen in die Apparatur integrierten kapazitiven Wegtransducer festgestellt. Er erzeugte ein zur Körperhöhe analoges Gleichspannungssignal und arbeitete in dem hier nötigen Bereich (± 10 mm) linear mit einer Amplitude bis zu 6 Volt. Das Transducersignal wurde zusammen mit den Myogrammen auf Magnetband aufgezeichnet. Am Ende aller Versuche mit einem Tier wurde anatomisch kontrolliert, ob die Elektroden richtig im *c2*-Muskel platziert waren. Hierzu präparierte ich unter dem Binokular die entsprechende *c2*-Region frei, indem ich schichtweise die angrenzende Muskulatur entfernte, bis die Elektroden schemenhaft durch die umgebende Faserschicht erkennbar waren. Es wurden nur Versuche mit korrekter Platzierung gewertet.

Ergebnisse

I. Für die Funktion des Coxamuskels *c2* wichtige anatomische Eigenschaften

1. *c2* liegt im Prosoma

Die Beinmuskulatur von Spinnen lässt sich in intrinsische und extrinsische Beinmuskeln einteilen. Die intrinsische Beinmuskulatur liegt im entsprechenden Bein selbst, während sich die extrinsischen Beinmuskeln im Vorderkörper, dem Prosoma, der Spinne befinden. Der *c2*-Muskel gehört als anteriorer Coxalevator zu dieser extrinsischen Muskulatur.

Im Prosoma liegen die vorderen Anteile des Verdauungstraktes, die Giftdrüsen, das Zentralnervensystem und die sehr gut entwickelte Extremitätenmuskulatur. Dorsal wird es von einer cuticularen, dicht behaarten Rückenplatte, dem Tergum, begrenzt. Ventral bildet die Bauchplatte, das Sternum, die ebenfalls cuticulare Begrenzung des Prosomas. Seitlich, zwischen Tergum und Sternum entspringen die Laufbeine aus der weichhäutigen Pleuralmembran mit den proximalsten Beingliedern, den Coxen. Sie sind der Wirkort des *c2*-Muskels, indem dieser am antero-dorsalen Coxarand als Levator und Promotor inseriert. Die genaue lateinische Bezeichnung von *c2* lautet „*Musculus tergo-coxalis medius anterior*“ [Nomenklatur nach Palmgren (1980)]. **Abbildung 1** verdeutlicht schematisch in Frontalansicht die Anordnung von *c2* im Prosoma-Coxa-Gelenk eines rechten Vorder- und Hinterbeines (R1 und R4). Bei der Abkürzung *c2* steht das *c* für coxaler Muskel, und die 2 dient als Numerierung. Insgesamt gibt es 8 Muskeln, die an der Coxa inserieren.

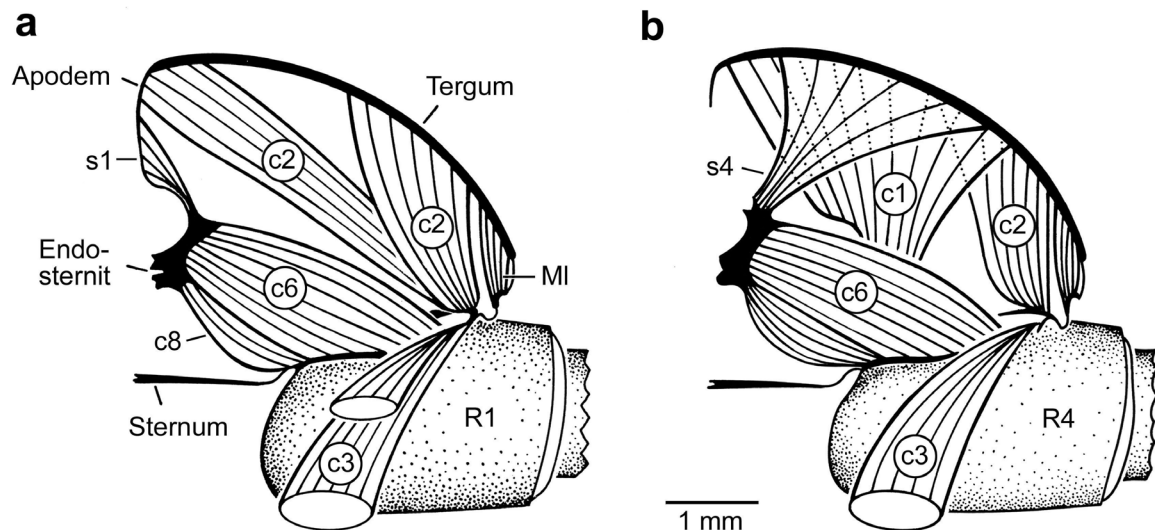


Abb. 1 Posteriore Frontal-Ansichten des Prosoma-Coxa-Gelenkes zeigen die Anordnung des anterioren Coxalevators **c2** (a) im rechten Vorderbein **R1** und (b) im Hinterbein **R4**. **c2** ist in den vorderen 1.–3. Beinpaaren zweigeteilt, im Hinterbein dagegen einteilig. Auch der posteriore Coxalelevator **c3** ist im Vorderbein zweigeteilt (zur besseren Ansicht in die vordere Bildebene geklappt) und einteilig im hinteren Beinpaar. **c6**, **c8**: Remotoren der Coxa, endosternale Muskulatur; **s1**, **s4**: Suspensor-Muskeln; **MI**: Lateralmuskulatur; **c1**: Coxadepressor. Muskelnomenklatur nach Palmgren (1978)

2. **c2** ist in den 1.–3. Beinpaaren zweiteilig, im Hinterbeinpaar einteilig

Vergleichende Präparationen des Prosoma-Coxa-Gelenkes der Beinpaare 1–4 zeigen einen prinzipiellen Unterschied in der Anordnung und Anatomie von **c2** in den vorderen Beinpaaren (1–3) gegenüber der Situation im Hinterbeinpaar (4). In den 1.–3. Beinpaaren liegt **c2** mit zwei separaten Anteilen vor, im 4. Beinpaar erscheint er als einzelner kompakter Muskel. **Abbildung 1** zeigt diesen anatomischen Unterschied in einer schematisierten Frontalansicht für jede Beinsituation. In **Abb. 1a**, der Vorderbeinsituation, verläuft ein **c2**-Teil vom vorderen Coxarand schräg zum tergalen Apodem (= apodemaler **c2**-Anteil), einer dorso-medianen kielartigen Cuticulaeinsenkung des Tergums. Der zweite Teil (= tergaler **c2**-Anteil) zieht dagegen senkrecht nach dorsal zum Tergum. **Abb. 1b** zeigt die Situation in den Hinterbeinen, wo **c2** als ungeteiltes Muskelfaserbündel vom anterioren dorsalen Coxarand direkt zum Tergum zieht.

3. Der Ursprung der *c2*-Muskeln ist in einer „tergale Landkarte“ von außen erkennbar

Die dorsale Tergumwand ist Ursprung von *c2* und weiteren extrinsischen Beinmuskeln (*c1*, *c3* und *s1–4*). **Abbildung 2** zeigt in einer Gegenüberstellung von Original-Präparat und Schema die Anordnung und den Ursprung von *c2* (jeweils rot) und weiteren extrinsischen Muskeln im Prosoma in dorsaler Ansicht. Die lateralen Begrenzungen der verschiedenen Muskelansätze sind auf Grund von Pigmenteinlagerungen in der Hypodermis von aussen eindeutig lokalisierbar (nach Entfernen der dichten Behaarung).

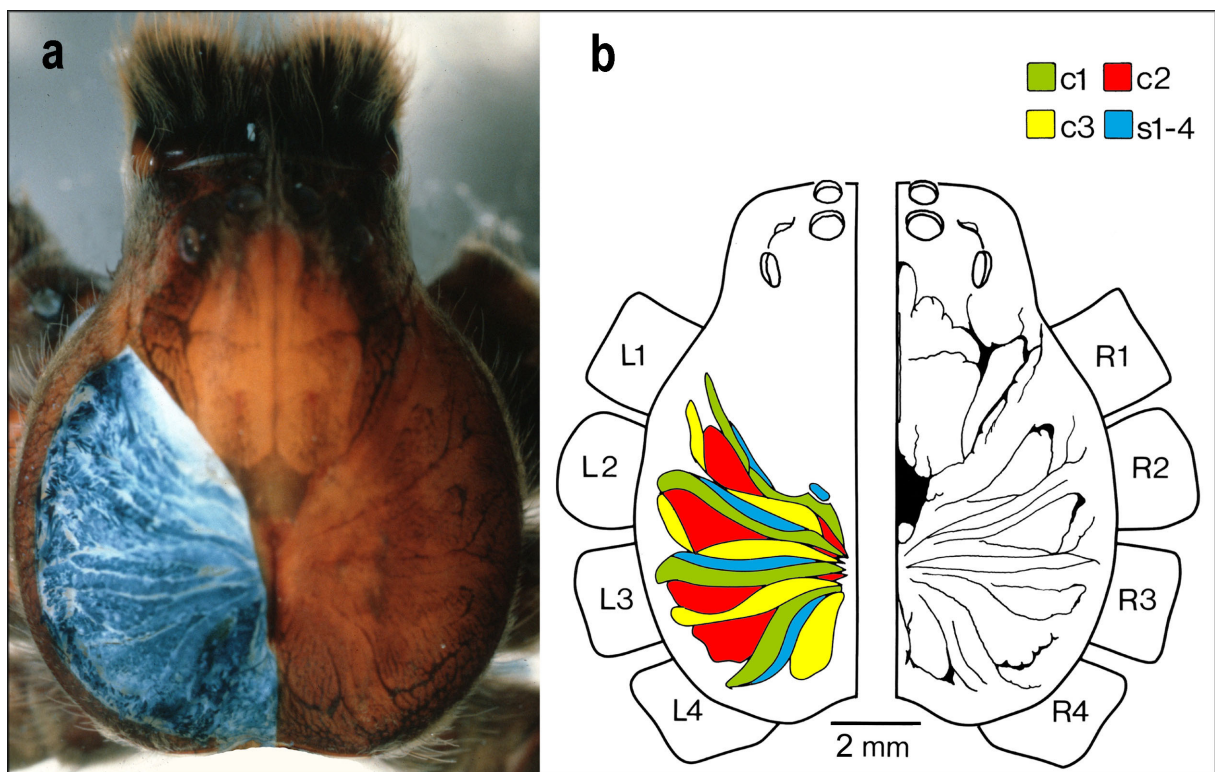


Abb. 2 Gegenüberstellung eines alkoholfixierten Prosomas von *C. salei* mit der entsprechenden schematisierten Muskelanordnung und tergale Pigmentierung (dorsale Ansicht). **(a)** *c2* liegt im Prosoma der Spinne und entspringt zusammen mit weiteren extrinsischen Beinmuskeln am Tergum (rasiert). Janus-Grün-B-Oberflächen-Färbung nach teilweiser Entfernung des Tergums (Präparat von Christine Leist). **(b)** Als „tergale Landkarte“ (rechts) bei den Präparationen und Myogrammableitungen dienen Pigmenteinlagerungen (links) in der Hypodermis, die die Muskelursprünge begrenzen. In den vorderen Beinpaaren **L1/R1–L3/R3** hat der anteriore Coxalevator *c2* (rot) zwei Ursprünge, im Hinterbeinpaar **L4/R4** nur einen. Sein Synergist *c3* (gelb), der posteriore Coxalevator, ist im ersten und zweiten Beinpaar zweigeteilt. Der Coxadepressor *c1* (grün) und die Suspensoren *s1–4* (blau) haben allein im 1. Beinpaar zwei Ursprünge. Muskelnomenklatur nach Palmgren (1978)

Das Prosoma-Präparat in **Abb. 2a** bietet nach teilweiser Entfernung der Cuticula einen fensterartigen Einblick auf die darunter liegenden Muskeln. In **Abb. 2b** wird deutlich, wie die Anordnung dieser Muskeln den Pigmenteinlagerungen und damit einem spezifischen Muster entsprechen. Dieses Muster ist bei jeder Spinne wieder auffindbar. Es dient als „tergale Landkarte“ zur Orientierung bei Präparationen für die histochemischen Untersuchungen (Eingrenzung der für Cryostatschnitten verwendeten Prosomaregion) und elektrophysiologischen Ableitungen (Platzierung der Elektroden im *c2* für Myogramableitungen). Auffällig ist die großflächige und dreieckige Form der ansetzenden tergalen *c2*-Anteile der 1.–3. Beinpaare sowie des kompakten *c2*-Muskels im hinteren Beinpaar. Dagegen hat jeder der apodemalen *c2*-Anteile einen viel kleineren, schmalen Ursprung am Tergum; sie sind erkennbar in **Abb. 2b** als rot kolorierte schmale Streifen seitlich des Apodems im Zentrum des Prosomas. Im Detail zeigt sich: Der *c2*-Muskel der 1.–3. Beinpaare hat 2 Stellen tergalen Ursprungs. (i) den distal gelegenen, im Querschnitt dreieckigen Ursprung des größeren tergalen *c2*-Anteils, und (ii) den proximal gelegenen, spindelförmigen Ursprung lateral am tergalen Apodem. Der *c2*-Muskel der Hinterbeine hat seinen einzigen Ursprung distal am Tergum in ebenfalls triangulärem Querschnitt.

Auch die anterior und posterior zu *c2* angrenzenden Beinmuskeln unterscheiden sich zwischen den Vorder- und Hinterbeinen. In den Vorderbeinen liegt sein Antagonist *c1*, ein Coxadepressor, anterior zu dem tergalen *c2*-Anteil. Posterior grenzt sein Synergist, der posteriore Coxalevator *c3*, an den tergalen *c2*-Anteil. In den Hinterbeinen grenzt anterior der *c3* des 3. Beins an *c2*. Der Coxadepressor *c1* liegt hier posterior zu *c2*. **Abbildung 2b** zeigt diese Anordnung koloriert für den jeweiligen Muskel in Dorsalansicht.

Die hier geschilderten Unterschiede für Aufbau und Anordnung der *c2*-Muskeln in Vorder- und Hinterbeinen der Spinne haben funktionelle Konsequenzen für den Kontraktionsmechanismus jeder Muskelfaser. Eng damit verknüpft ist eine unterschiedliche *c2*-Beteiligung

an der Beinbewegung der Spinne. Aus welchen Fasern setzt sich also der *c2*-Muskel in den Vorder- und Hinterbeinen zusammen?

II. *c2* ist aus Fasern mit heterogenen Eigenschaften aufgebaut

Basierend auf der oben geschilderten Anordnung des *c2*-Muskels in den einzelnen Laufbeinen, folgt nun eine detaillierte Beschreibung der *c2*-Anatomie auf der Ebene einzelner, identifizierbarer Muskelfasern.

1. Der *c2*-Muskel der Vorder- und Hinterbeine setzt sich aus vier verschiedenen Muskelfasertypen zusammen

In horizontalen, Methylenblau-gefärbten Querschnitten schockgefrorener Prosomaviertel ist der *c2*-Muskel auf Grund seiner typischen dreieckigen Anschnittsfläche in der umgebenden Prosomamuskulatur gut auffindbar. Mosaikartig setzen sich einzelne Muskelfasern dicht an dicht zum Gesamtbild des *c2*-Muskels zusammen. Dabei grenzt sich deutlich jeder Muskelfaserquerschnitt durch die Membran, das Sarkolemm, von den benachbarten Fasern ab. Die Faserzusammensetzung des *c2*-Muskels ist nicht homogen. Im mikroskopischen Querschnitt fällt sofort eine Heterogenität des tergalen *c2*-Anteils in zwei Faserpopulationen unterschiedlicher Querschnittsflächen auf: Ein zentrales Bündel mit Fasern geringeren Durchmessers wird von einem peripheren Bündel deutlich dickerer Fasern umgeben. Die Grenze zwischen diesen beiden Faserbündeln wirkte bei den Präparationen zur Faserisolierung (siehe Material und Methoden) im gefriergetrockneten *c2*-Muskel stets wie eine „Sollbruchstelle“. Der für den Glykogennachweis gefärbte Gefrierschnitt durch den *c2*-Muskel eines Hinterbeines in **Abb. 3** zeigt, wie die dünnen Fasern des zentralen Bündels (oben) an die dickeren des peripheren Bündels (unten) grenzen. Weiterhin wird deutlich, dass sich die zwei Faserpopulationen anatomisch auch in der Art und Weise ihrer Membrani-

sierung unterscheiden; während die größeren Fasern Einfaltungen des Sarkolemmms 1. und 2. Ordnung aufweisen, zeigen die Fasern des zentralen Bündels nur ein geringes Verzweigungssystem ihres Sarkolemmms. Diese Heterogenität ist sowohl im Vorder- als auch im Hinterbeinmuskel vorzufinden.

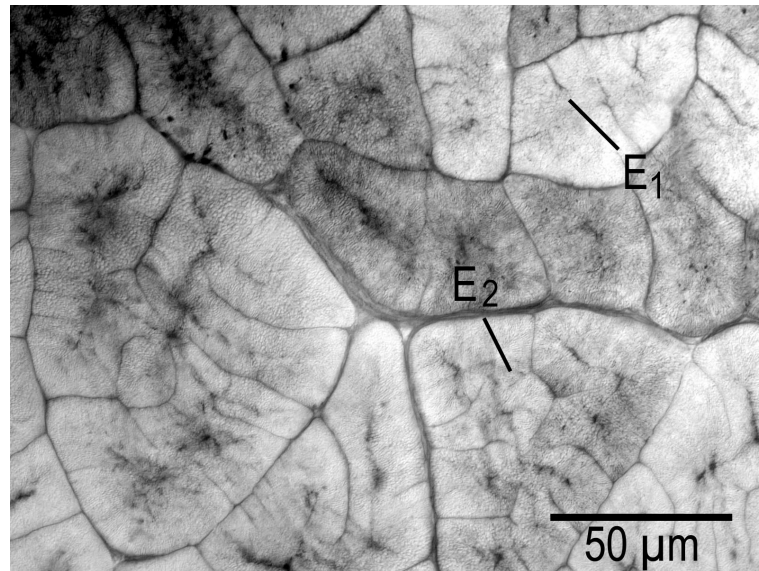
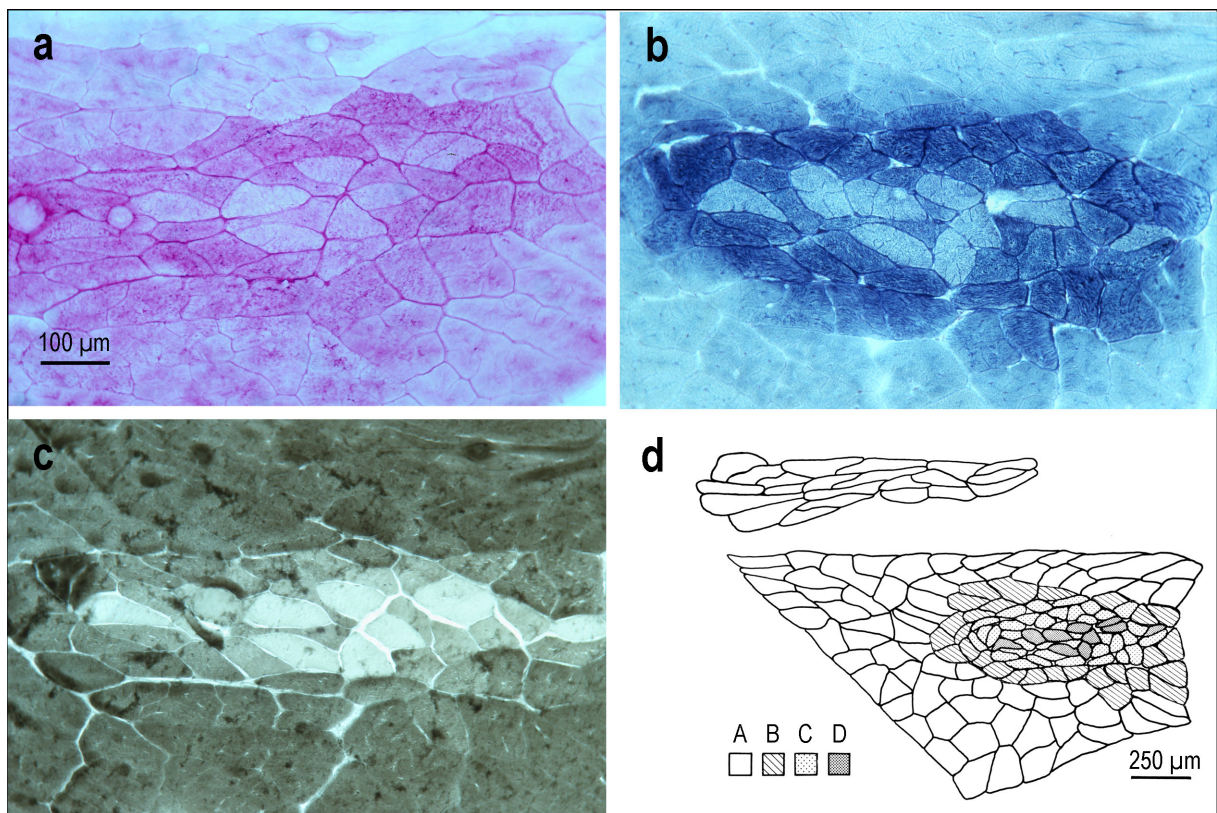


Abb. 3 Vergleich der Membranisierung von zentralen Muskelfasern (obere Bildhälfte) mit der peripherer Fasern (untere Bildhälfte) in einem *c2*-Querschnitt eines Hinterbeines. Zentrale Fasern besitzen nur einfache Sarkolemmfaltungen 1. Ordnung (E_1). Die Membran der größeren, peripheren Fasern dagegen verzweigt sich noch weiter zu Einfaltungen 2. Ordnung (E_2). Gefrierschnitt mit Glykogennachweis

Jede Faser hat eine individuell für jedes Präparat charakteristische Anschnittsfläche, die in aufeinanderfolgenden Querschnitten gut zu verfolgen ist. Dies war eine Voraussetzung für die histochemische Typisierung der Muskelfasern an Gefrierschnitten, bei der sukzessive an direkt hintereinander folgenden Schnitten die 3 verschiedenen histochemischen Nachweise für SDH, ATPase und Glykogen (siehe Material und Methoden III.) erfolgten.

Die genannten histochemischen Nachweisreaktionen zeigen innerhalb der zwei anatomisch unterscheidbaren Faserpopulationen noch jeweils zwei Untertypen, so dass für den *c2*-Muskel der Vorder- und Hinterbeine insgesamt vier Fasertypen unterschieden werden können. In Anlehnung an Maier, Root und Seyfarth (1987) und die Nomenklatur der Fasertypen im Krallenhebermuskel bei *C. salei*, werden die vier verschiedenen Fasergruppen des *c2*-Muskels

im Folgenden mit Typ A, B, C und D bezeichnet. **Abbildungen 4** (Vorderbein) und **Abb. 5** (Hinterbein) zeigen Original-Gefrierschnitte von *c2* mit den typischen Faser-Farbreaktionen für den jeweiligen histochemischen Nachweis und die daraus folgende schematische „Kartierung“ von *c2* mit den vier Faserpopulationen. Die hier erfolgte Typisierung in vier Fasergruppen basiert zum einen auf unterschiedlichen Reaktionen bei den histochemischen Tests und zum anderen auf den unterschiedlichen Querschnittsmaßen der Fasern.



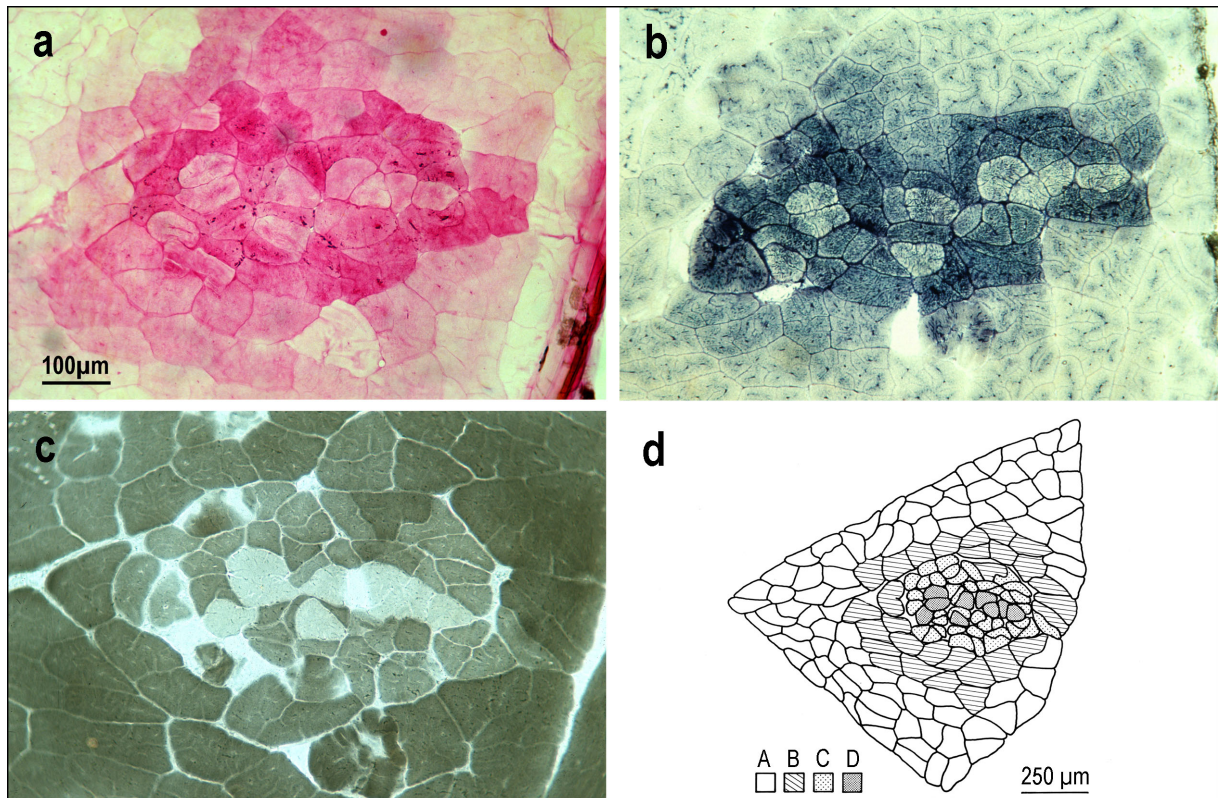


Abb. 5 Histochemische Fasertypisierung im *c2* der Hinterbeine. Gegenüberstellung eines jeweils für (a) Glykogengehalt, (b) SDH- und (c) ATPase-Aktivität inkubierten nativen Gefrierschnitts (Ausschnitt zeigt jeweils nur das zentrale Bündel) mit der schematisierten Fasertypenordnung im *c2*-Querschnitt (d). Der Muskel ist ähnlich wie in den Vorderbeinen aus vier verschiedenen Fasertypen *A*, *B*, *C*, *D* zusammengesetzt. Fasertypen *A* und *B* bilden die *c2*-Peripherie, *C* und *D* das zentrale Bündel. Alle 3 Schnitte stammen aus demselben Präparat

Muskelfasertyp A: A-Fasern sind die dicksten Fasern. Sie zeigen den niedrigsten Glykogengehalt und die geringste SDH-Aktivität, bei höchster myofibrillärer ATPase-Aktivität (bei pH 9,4). Ihre ATPase ist säurestabil bis zu einem pH von 4,5 und zeigt bei einer Vorbehandlung bei pH 4,4 und pH 10,2 keine Aktivität mehr. A-Fasern machen die Mehrheit aller Fasern aus (76 % der Gesamtquerschnittsfläche im Vorderbein und 63 % im Hinterbein). Sie bilden die äußersten Faserschichten der peripheren Faserbündel aller tergalen *c2*-Anteile und setzen allein den apodemalen *c2*-Anteil der Vorderbeine zusammen.

Muskelfasertyp B: B-Fasern sind nach den A-Fasern der zweithäufigste Typ im *c2*-Muskel, sie sind auf das periphere Faserbündel im tergalen Anteil der Vorder- (26 %) und Hinterbeine (22 %) beschränkt. Die B-Fasern umsäumen ringförmig das zentrale Bündel. Die B-Fasern sind dünner als die A-Fasern, aber deutlich dicker als die C- und D-Fasern. Der Glykogen-Gehalt und die SDH-Aktivität sind höher, die ATPase-Aktivität ist geringer als bei den A-Fasern. Die ATPase der B-Fasern ist säurestabil bis zu einem pH von 4,5.

Muskelfasertyp C: C-Fasern sind auf das zentrale Bündel des tergalen *c2*-Anteils beschränkt und stellen dort die Mehrheit der Fasern. Sie machen 9 % der Gesamtfläche im Vorderbein und 12 % im Hinterbein aus. Die C-Fasern sind die dünnsten Fasern des *c2*-Muskels und haben den höchsten Glykogengehalt und die höchste SDH-Aktivität von allen Fasertypen. Sie besitzen eine mittlere ATPase-Aktivität, die sowohl bei saurer als auch bei alkalischer Preinkubation stabil bleibt.

Muskelfasertyp D: D-Fasern stellen die Minderheit aller Muskelfasern im *c2*-Muskel der Vorder- (3 %) und der Hinterbeine (3 %). Sie kommen nur im zentralen Bündel der tergalen Anteile vor. D-Fasern zeigen die geringste ATPase-Aktivität von allen Fasern bei mittlerer SDH-Aktivität und mittlerem Glykogengehalt.

Das Verteilungsmuster der Fasertypen A, B, C, D ist im tergalen *c2*-Anteil der Vorder- und Hinterbeine nahezu gleich: Wie jeweils in **Abb. 4d** und **5d** veranschaulicht, besteht der periphere Ring dickerer Fasern jeweils aus Typ-A- und B-Fasern, während sich das zentrale Bündel aus dünneren Fasern des Typs C und D zusammensetzt. Der apodemale Anteil der Vorderbeine ist homogen und besteht nur aus Typ-A-Fasern, wie die Zeichnung in **Abb. 4d** erkennen lässt. Die histochemischen Eigenschaften und jeweiligen Dimensionen der Fasern sind für die Vorder- und Hinterbeinsituation jeweils separat in den **Tabellen 1** und **2** zusammengefasst.

Tabelle 1 Vorderbein: Zusammenfassung der wichtigsten Faserdimensionen des *c2*-Muskels und Ausprägung der histochemischen Aktivität für die vier Fasertypen. Die relative Intensität der Färbereaktionen wurde nach der Methode von Hart und Fournier (1979) klassifiziert: 4 (75–100 %); 3 (50–75 %); 2 (25–50 %); 1 (1–25 %); 0 (keine erkennbare Aktivität)

	A _{apo} -Fasern	A-Fasern	B-Fasern	C-Fasern	D-Fasern
Faseranzahl	22	66	26	33	10
Anschnittfläche (%)	17	59	12	9	3
mittl. max. min. Durchmesser ± SD (µm)	279 ± 72 55 ± 17	187 ± 49 87 ± 29	136 ± 37 68 ± 20	104 ± 29 44 ± 12	112 ± 29 50 ± 8
SDH-Aktivität	1	1	2 (3)	3 (4)	1 (2)
ATPase-Aktivität keine Vorinkubation	4	4	2 (3)	2 (3)	0 (1)
Vorink. pH 4,5	1	1	2	3	0
Vorink. pH 4,4	0	0	0	1	0
Vorink. pH 10,2	0	0	0	2 (3)	1
Glykogengehalt	0 (1)	0 (1)	2	3 (4)	2

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Faseraufbau des *c2*-Muskels in Vorder- und Hinterbeinen morphologisch und histochemisch heterogen ist. Beide Parameter, sowohl der Faserdurchmesser als auch die Aktivität der untersuchten Enzyme, bestimmen die Kontraktionsgeschwindigkeit und -kraft und sind somit eng mit der *c2*-Funktion im Verhalten der Spinne verknüpft. Es ist davon auszugehen, dass A- und B-Fasern mehr Kraft produzieren und sich schneller kontrahieren als C- und D-Fasern.

Tabelle 2 Hinterbein: Zusammenfassung der wichtigsten Faserdimensionen des *c2*-Muskels und Ausprägung der histochemischen Aktivität für die vier Fasertypen. Klassifikation der Färbereaktion wie in Tabelle 1

	A-Fasern	B-Fasern	C-Fasern	D-Fasern
Faseranzahl	86	28	38	9
Anschnittfläche (%)	63	22	12	3
mittl. max. min. Durchmesser ± SD (µm)	127 ± 26 67 ± 19	132 ± 23 72 ± 12	75 ± 19 40 ± 16	70 ± 11 45 ± 11
SDH-Aktivität	1	2 (3)	3 (4)	1 (2)
ATPase-Aktivität				
keine Vorinkubation	4	4	2 (3)	0 (1)
Vorink. pH 4,5	2	2	1 (2)	0
Vorink. pH 4,4	1	1	1	0
Vorink. pH 10,2	0	0	0 (1)	0
Glykogengehalt	0 (1)	2	3 (4)	2

2. Die Sarkomerlängen der A- und B-Fasern sind kürzer als die der C- und D-Fasern

Ein weiterer Parameter, der bestimmt, wie schnell sich eine Muskelfaser kontrahiert, ist die Länge ihrer kleinsten kontraktile Einheit, dem so genannten Sarkomer. Sarkomerlänge und Kontraktionsgeschwindigkeit sind wie folgt miteinander korreliert: je länger das Sarkomer, desto langsamer und je kürzer, umso schneller erfolgt die Kontraktion der Muskelfaser (Jahromi und Atwood 1969). Es stellte sich daher die Frage, ob und wie sich die einzelnen Fasertypen des *c2*-Muskels in ihrer Sarkomerlänge unterscheiden. Die Messungen der Sarkomerlängen an isolierten und typisierten Fasern von insgesamt 5 *c2*-Muskeln (2 Vorderbein- und 3 Hinterbeinmuskeln) mit Laserdiffraktometrie ergaben folgende Ergebnisse:

Die Sarkomerlängen reichen von minimal 4,4 μm (A-Fasern des apodemalen Teils im Vorderbein, Spinne #5) bis maximal 12,3 μm (C/D-Fasern des zentralen Bündels im Hinterbein, Spinne #3). Generell haben die peripheren Fasern vom histochemischen Typ A und Typ B kürzere Sarkomerlängen als die Fasern des zentralen Bündels, also der histochemischen Typen C und D. **Tabelle 3** fasst die Durchschnitts- und Extremwerte der Sarkomerlängen für jeden der 4 Fasertypen zusammen.

Tabelle 3 Mittlere Sarkomerlängen und Extremwerte für den jeweiligen Fasertyp bei 5 Spinnen. Die A- und B-Fasern haben kürzere Sarkomerlängen als die C- und D-Fasern. Bei Spinne #3 wurde im Hinterbein *c2* nicht zwischen C- und D-Fasern, bei Spinne #6 zusätzlich nicht zwischen A- und B-Fasern unterschieden.

<i>c2</i> in Spinne	mittlere Sarkomerlänge [$\mu\text{m} \pm \text{SD}$] (Extremwerte) für Fasertyp				
	A _{apo} -Fasern	A-Fasern	B-Fasern	C-Fasern	D-Fasern
#3 Vorderbein	6,8 \pm 0,7 (5,5–8,3) n=17	6,3 \pm 0,7 (5,4–8,1) n=23	6,4 \pm 0,7 (5,1–7,9) n=17	8,2 \pm 1,2 (5,8–10,1) n=18	7,7 \pm 1,1 (6,9–9,5) n=5
#5 Vorderbein	6,1 \pm 1,3 (4,4–8,1) n=21	6,7 \pm 0,7 (5,7–8,1) n=21	6,4 \pm 0,6 (4,8–7,3) n=17	8,1 \pm 1,3 (5,1–10,4) n=32	8,2 \pm 1 (6,8–9,8) n=8
#2 Hinterbein	/	8,1 \pm 0,9 (6,2–9,8) n=39	7,8 \pm 0,5 (6,8–8,6) n=22	8,8 \pm 0,7 (7,1–10,2) n=39	8,9 \pm 0,6 (8,3–9,5) n=7
#3 Hinterbein	/	9,4 \pm 0,7 (8,3–10,7) n=20	9,5 \pm 0,7 (8,5–10,7) n=16	351 \pm 0,9 (8,9–12,3) n=21	
#6 Hinterbein	/	6,8 \pm 1 (4,7–9,1) n=23		7,5 \pm 1,1 (6–9,6) n=23	

Die mittleren Sarkomerlängen der A- und B- Fasern unterscheiden sich statistisch signifikant von denen der C- und D-Fasern ($p < 0,0001$). Dies ist sowohl im Vorderbein als auch im Hinterbein der Fall. Die mittlere Sarkomerlänge der tergalen A-Fasern unterscheidet sich nicht signifikant von der in den apodemalen A-Fasern. Die Sarkomerlängen der A- und B-Fasern und der C- und D-Fasern untereinander unterscheiden sich nicht signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung in den **Tabellen 4** und **5** sind exemplarisch für einen Vorderbein- (Spinne #5) und einen Hinterbeinmuskel (Spinne #2) zusammengefasst.

Tabelle 4 Vorderbein: mittlere Sarkomerlängen in den c2-Fasern von Spinne #5; Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede; unpaarer t-Test (für unabhängige Stichproben) für homogene Varianzen nach Student

Fasertyp	A	B	C	D
A _{apo}	- ($p > 0,7$)	- ($p > 0,4$)	+ ($p < 0,0001$)	+ ($p < 0,001$)
A		- ($p > 0,1$)	+ ($p < 0,0001$)	+ ($p < 0,0001$)
B			+ ($p < 0,0001$)	+ ($p < 0,0001$)
C				- ($p > 0,7$)

- = mittlere Sarkomerlänge unterscheidet sich nicht signifikant,
 + = mittlere Sarkomerlänge unterscheidet sich signifikant

In den beiden Vorderbeinmuskeln beträgt der Bereich zwischen minimal und maximal erreichter Sarkomerlänge 5 μm (Spinne #3) bzw. 6 μm (Spinne #5). In den Hinterbeinmuskeln (Spinne #2 und #3) ist diese Spanne mit 4 μm etwas geringer.

Tabelle 5 Hinterbein: mittlere Sarkomerlängen in den *c2*-Fasern von Spinne #2; Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede; unpaarer t-Test (für unabhängige Stichproben) für homogene Varianzen nach Student

Fasertyp	B	C	D
A	- ($p > 0,1$)	+ ($p < 0,0003$)	+ ($p < 0,05$)
B		+ ($p < 0,0001$)	+ ($p < 0,0002$)
C			- ($p > 0,8$)

- = mittlere Sarkomerlänge unterscheidet sich nicht signifikant,

+ = mittlere Sarkomerlänge unterscheidet sich signifikant

In **Abb. 6** wird für je zwei Vorderbein- und Hinterbeinmuskeln die Häufigkeitsverteilung der Sarkomerlängen für die Grundgesamtheiten der peripheren *c2*-Fasern (Typ A_{apo} , A, B) und der zentralen Fasern (Typ C und D) gezeigt. Maximale Sarkomerlängen werden bei allen untersuchten Muskeln nur von Fasern aus der C- und D-Population des zentralen *c2*-Bündels erreicht. Minimale Sarkomerlängen weisen vor allem die in der *c2*-Peripherie gelegenen A_{apo} -, A-, und B-Fasern auf. Es kommen aber auch vereinzelt C- und D-Fasern vor, deren Sarkomere ebenfalls so kurz sind wie in A_{apo} -, A-, und B-Fasern (**Abb. 6a, b**). Im mittleren Sarkomerlängenbereich eines jeden untersuchten Muskels kommt es zu „Überlappungen“, d. h. zu Längenwerten, die von beiden Faserpopulationen erreicht werden. Innerhalb dieses mittleren Bereiches (ca. 6–9 μm) hat jede Faserpopulation ihr eigenes Maximum. Für beide Vorderbeinmuskeln (SL3 bzw. SL5) gilt, dass 47 % bzw. 42 % aller untersuchten A_{apo} -, A-, und B-Fasern mit ihrer Sarkomerlänge zwischen 6 μm und 7 μm liegen (**Abb. 6a** und **b**). Die Häufigkeitsverteilung der Sarkomerlänge der C- und D-Fasern zeigt hingegen, dass die Mehrzahl (39 % bzw. 43 %) der Fasern eine Sarkomerlänge zwischen 8 μm und 9 μm haben.

Im Hinterbeinmuskel der Spinne #3 haben die A_{apo} -, A- und B-Fasern ihr Häufigkeitsmaximum mit 17 % zwischen 8 μm und 9 μm , die C- und D-Fasern dagegen mit über 50 % zwischen 11 μm und 12 μm (Abb. 6c).

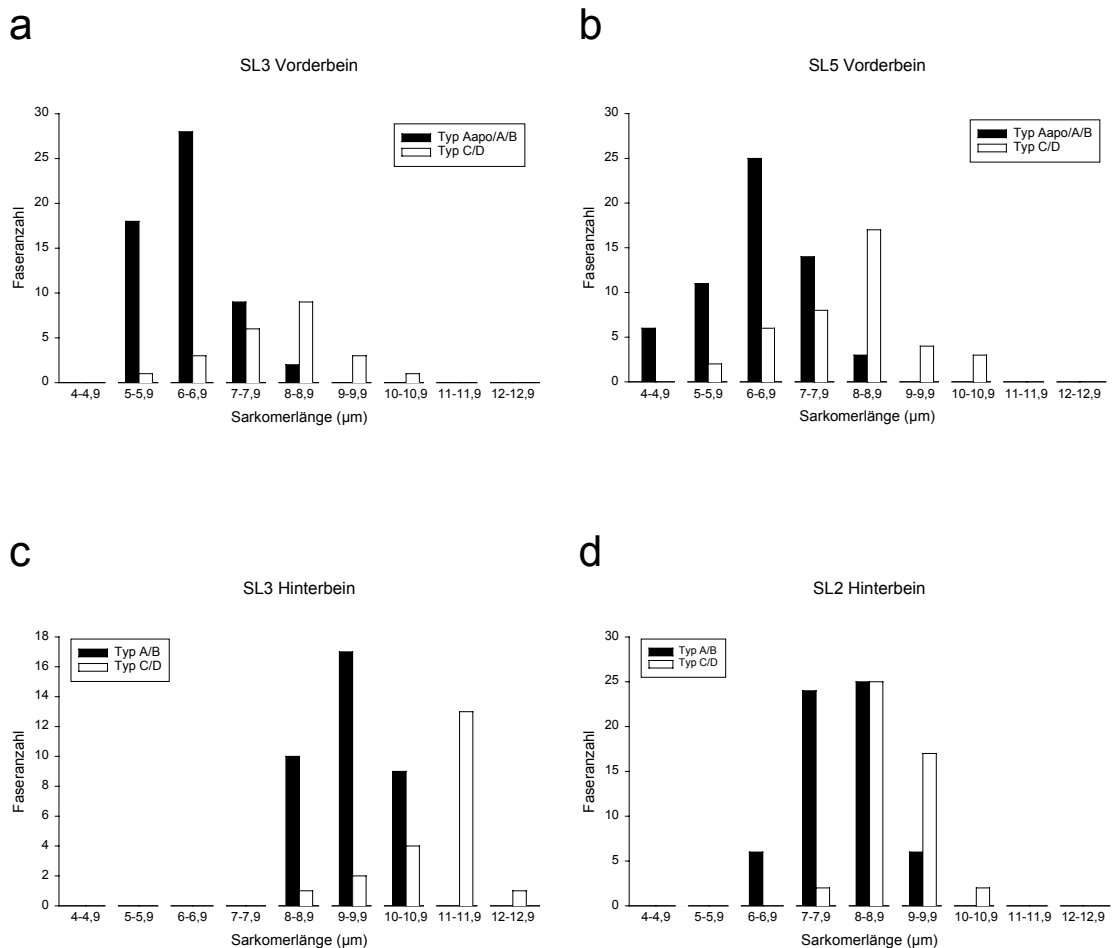


Abb. 6 Häufigkeitsverteilung der Sarkomerlängen bei drei Versuchstieren. A_{apo} -, A-, B-Fasern und C-, D-Fasern sind jeweils zusammengefasst, da sich die Mittelwerte ihrer Sarkomerlängen nicht signifikant unterscheiden. (a) c2 aus Vorderbein (Spinne #3) (b) c2 aus Hinterbein (Spinne #5) (c) c2 aus Hinterbein (Spinne #3) (d) c2 aus Hinterbein (Spinne #2). Kurze Sarkomerlängen werden vermehrt von den in der c2-Peripherie gelegenen A_{apo} -, A-, und B-Fasern erreicht. Maximale Sarkomerlängen werden nur von C- und D-Fasern erreicht. SL: Sarkomerlängen

Insgesamt gilt, dass sich die Sarkomerlängen der Fasertypen A_{apo} , A und B signifikant von denen der Typen C und D unterscheiden. A_{apo} -, A- und B-Fasern haben durchschnittlich kürzere Sarkomeren als die C- und D-Fasern. Funktionell deutet dies darauf hin, dass die Fasern vom Typ A_{apo} , A und B schneller kontrahieren als die vom Typ C und D.

3. Jeder Fasertyp exprimiert spezifische Proteinisoformen

Im folgenden Abschnitt wird die Frage beantwortet, ob es für die histochemisch charakterisierten Fasertypen des *c2*-Muskels fasertypspezifische Proteine bzw. Isoformen gibt. Wo liegen Gemeinsamkeiten und wo Unterschiede im Proteinmuster der Muskelfasertypen? Gibt es innerhalb desselben Fasertyps lagespezifische Merkmale im Proteinmuster (Vorderbein versus Hinterbein)?

In den verschiedenen Fasertypen des *c2*-Muskels lassen sich charakteristische Motor- und Regulatorproteine ausmachen. **Abbildungen 7** und **8** zeigen für den jeweiligen Fasertyp das Originalgel nach der elektrophoretischen Aufspaltung in die einzelnen Proteinbanden. In **Abb. 7** werden die Proteinbanden von A-Fasern mit denen der C/D-Fasern verglichen. Außerdem sind hier auch noch die Aufspaltungen der im Gel mitgeladenen Proteinstandards in Proteinbanden mit einem definierten Molekulargewicht zu sehen (bei den folgenden Abbildungen wird nur noch das Molekulargewicht der definierten Komponenten der Proteinstandards gezeigt). In **Abb. 8** werden die Proteinbanden aller Fasertypen eines *c2*-Muskels miteinander verglichen. Die D-Fasern sind hier zusammen mit den C-Fasern geladen worden, da sie zahlenmäßig so gering im Muskel auftreten (nur 9 Fasern pro Muskel) und sich ihre Sarkomerlängen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Jeder Bande lässt sich auf Grund ihres Molekulargewichtes ein möglicher Protein-„Kandidat“ zuordnen (Abkürzungs-erklärungen siehe separate Liste am Ende dieses Kapitels, Seite 47).

Die Fasern des *c2*-Muskels enthalten singuläre Banden für die schweren Ketten des Myosins (HC bei 200 kDa), für Aktin (A bei 44 kDa) und für Tropomyosin (TM bei 41 kDa) sowie mehrere Banden (Isoformen) für Paramyosin (P₁ bei 107 kDa, P₂ bei 102 kDa), für Troponin-T (T₁ bei 52 kDa, T₂ bei 50 kDa, T₄ bei 46 kDa), für Troponin-I (I₁ bei 28 kDa, I₂ bei 27 kDa) und für die leichten Ketten des Myosins (LC₁ bei 24 kDa, LC₂ bei 22 kDa, LC₃ bei 21 kDa und LC₄ bei 19 kDa). Die genannten myofibrillären Proteine und zusätzliche, nicht eindeutig zuzuordnende Proteinbanden (43 kDa, 35–31 kDa) sind unterschiedlich auf

die Fasertypen des *c2*-Muskels verteilt: entweder kommen faserspezifische oder für bestimmte Fasertypen vermehrt auftretende Isoformen vor. Zur Verdeutlichung fasst **Tabelle 6** diese Ergebnisse für die einzelnen Muskelfasertypen dreier Gele (aus einem Tier) zusammen. Die Hauptunterschiede betreffen Isoformen der Proteine Paramyosin, Troponin und der leichten Ketten des Myosins. Sie werden im Folgenden genau beschrieben:

P₁: Diese Isoform kommt ausschließlich in A- und B-Fasern vor. Die durch die Histochemie und die Sarkomerlängenmessungen als „schnell kontrahierend“ typisierten A- und B-Fasern besitzen eine Paramyosinvariante P₁ bei 107 kDa zusätzlich zu der gemeinsam mit den C- und D- Fasern vorhandenen Paramyosin-Isoform P₂ bei 102 kDa (**Abb. 7** Sternchen).

T₁, T₂ und T₄: Alle Fasertypen enthalten die Troponin-T₁-Isoform mit 52 kDa in ähnlichem Ausmaß, während T₂ in den C- und den gemeinsam geladenen C/D-Fasern mit einem Molekulargewicht von 50 kDa vermehrt vorkommt (**Abb. 7, 8**). Nur bei den A- und B-Fasern ist ein 46-kDa-Protein stark ausgeprägt, bei dem es sich wahrscheinlich um eine weitere Troponin-Isoform (T₄) handelt. T₄ tritt besonders deutlich bei den Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung in **Abb. 9, 10** hervor.

I₁ und I₂: Die A-Fasern weisen beide Troponin-I-Isoformen (27 und 28 kDa) auf, während bei den B-Fasern nur die I₂-Variante vorkommt (**Abb. 8**).

43-kDa-Bande: Unterhalb der Aktin-Bande, die bei allen Fasertypen gleichmäßig stark bei 44 kDa hervortritt, weisen die C und C/D-Fasern eine dünne 43 kDa-Bande auf, die den A- und B-Fasern fehlt (**Abb. 7, 8**). Diese Bande konnte keinem bisher bekannten Muskelprotein zugeordnet werden.

35–31-kDa-Bereich: Die zentralen C/D-Fasern haben im Vergleich zu den peripheren A-Fasern vermehrt Proteinbanden im Bereich von 35–31 kDa, die den B-Fasern fehlen. Dieser Bandenbereich ist im Gel von **Abb. 8** bei den C-Fasern mit einer Klammer gekennzeichnet. Auch diese Banden konnten keinem bisher bekannten Muskelprotein zugeordnet werden.

Leichte Ketten des Myosins (MLC): Allen Fasern gemeinsam ist die LC₁-Isoform bei 24 kDa. Sowohl die A- als auch die B-Fasern exprimieren bei 22 kDa eine stark ausgeprägte LC₂-Isoform, die den C- und D-Fasern fehlt. Diese LC₂-Banden sind im Proteinmuster der A-Fasern (**Abb. 7**) und der A- und B-Fasern (**Abb. 8**) je mit einem Sternchen gekennzeichnet. Allen Fasertypen gemeinsam sind die LC₃- und LC₄-Isoformen mit 19 und 21 kDa (**Abb. 7, 8**). Wie die Untersuchung eines anderen Individuums mit anderer Färbung zeigte, gibt es allerdings Unterschiede bei den MLCs (s. u.).

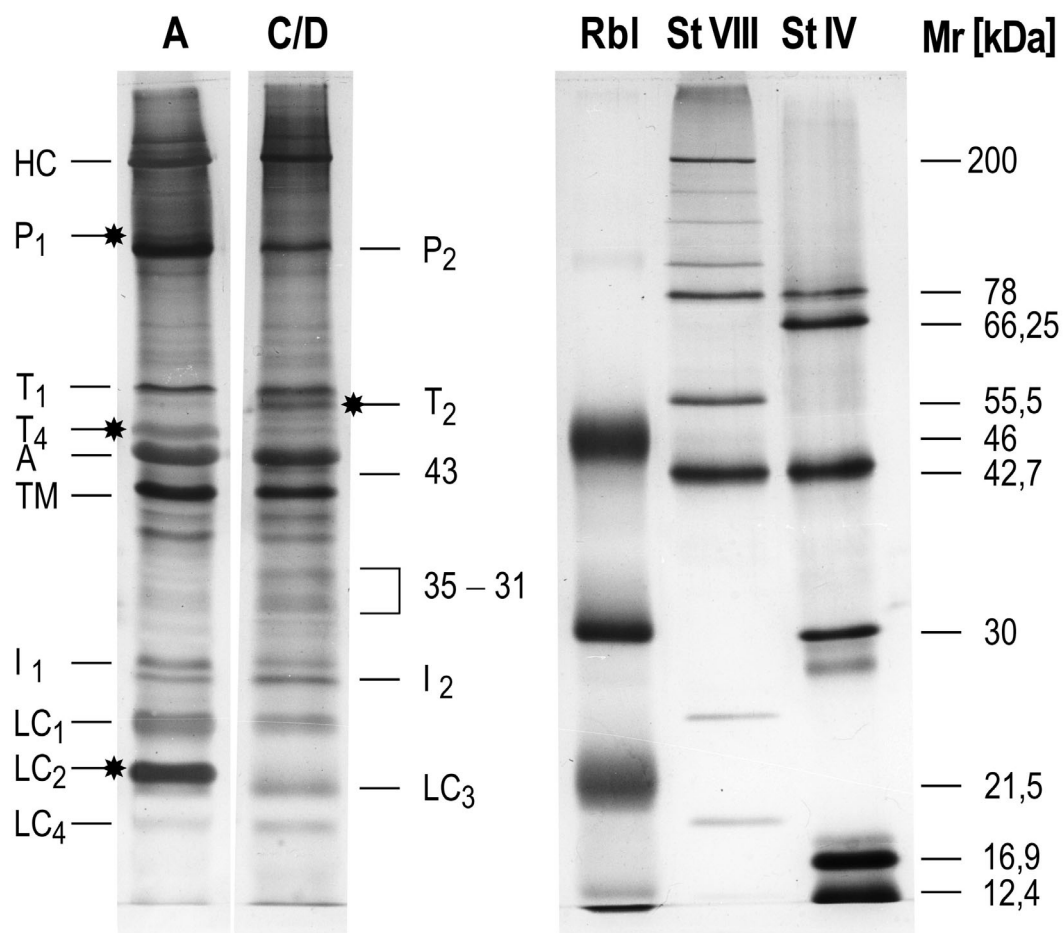


Abb. 7 Vergleich der Polypeptidmuster von isolierten *A*-Fasern mit den *C/D*-Fasern von Muskel *c2*; SDS-PAGE (15 % Gel); Silbernitrat-Färbung. Links: Fasertypen mit den Abkürzungen möglicher Proteinkandidaten (siehe Abkürzungsliste); Die auffälligsten Unterschiede finden sich bei Isoformen des Paramyosins (*P*), beim Troponin-T (*T*) und bei leichten Ketten des Myosins (*LC*) (Sternchen). Rechts: Auftrennung dreier Standardproteingemische (*Rbl*, *St VIII*, *St IV*) mit den molekularen Massen (*Mr*) der Hauptkomponenten

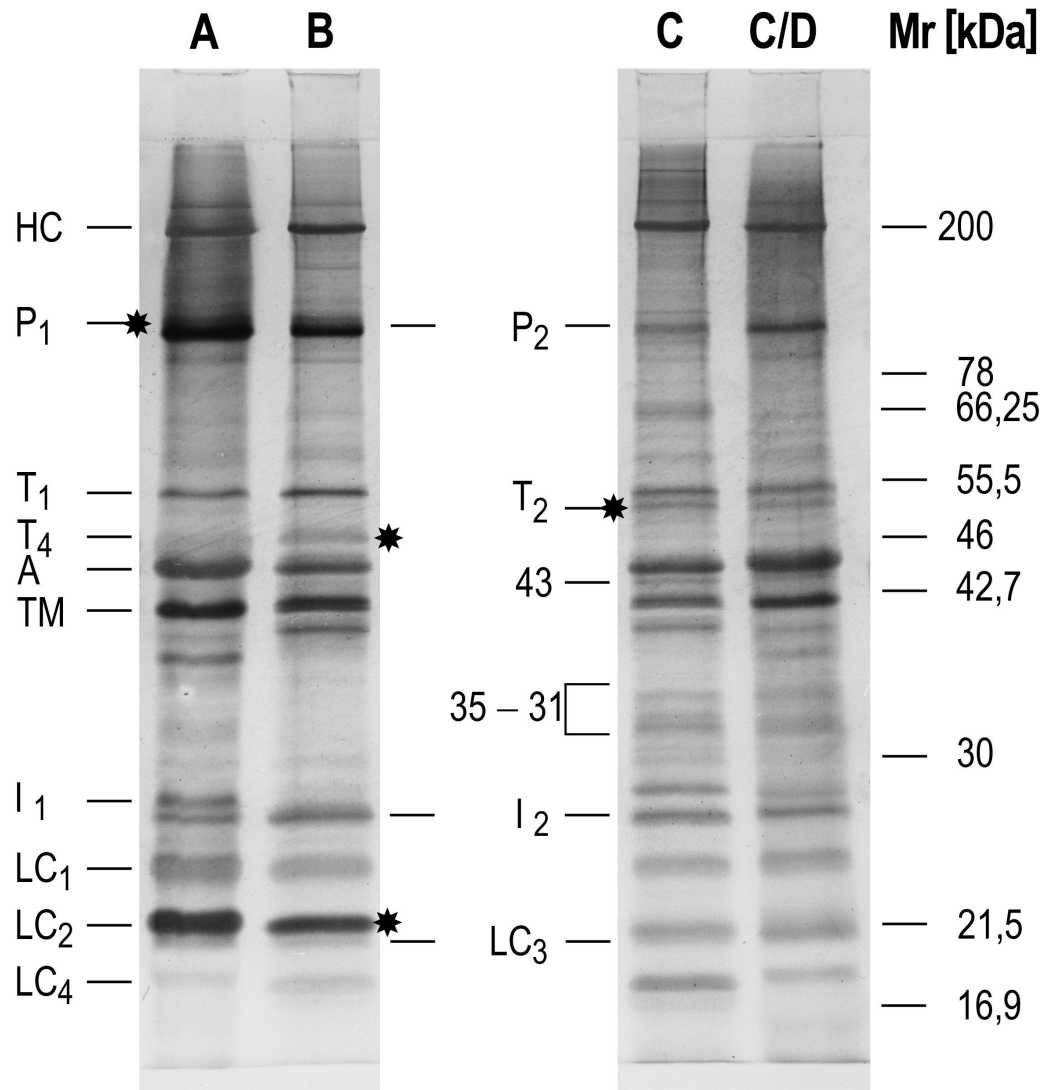


Abb. 8 „Faserprofil“ des *c2*-Muskels, Vergleich der Polypeptidmuster aller Fasertypen untereinander; SDS-PAGE (15 % Gel); Silbernitrat-Färbung. **C/D** Fasern wurden kombiniert, da sich ihre Sarkomerlänge nicht signifikant unterscheidet und pro Muskel nur 9 **D**-Fasern vorkommen. Die Fasertypen des *c2*-Muskels unterscheiden sich in ihren Polypeptid-Isoformen. Beachtenswert ist das alleinige Auftreten von **P₁** bei **A**- und **B**- Fasern, **T₂** bei **C**- und **C/D**-Fasern, **T₄** bei **A**- und **B**-Fasern und **LC₂** bei **A**- und **B**-Fasern (Sternchen). Links und Mitte: Bezeichnung möglicher Proteinkandidaten (siehe Abkürzungsliste). Rechts: molekulare Massen (**Mr**) der Hauptkomponenten der Standardproteingemische (**Rbl**, **Rbh**, **StIV** und **StVIII**)

Tabelle 6 Die Fasertypen des *c2*-Muskels unterscheiden sich in ihren Protein-Isoformen. Die Hauptunterschiede liegen beim Paramyosin, Troponin-T, den leichten Ketten des Myosins und bei einer 43-kDa-Bande (farblich gekennzeichnet). SDS-Page nach Laemmli (1970)

Protein-Kandidat	apparente molekulare Masse [kDa]	Fasertyp im <i>c2</i> -Muskel			
		<i>c2</i> : Peripherie		<i>c2</i> : zentrales Bündel	
		A	B	C	C/D
Myosin HC	200	++	++	++	++
Paramyosin					
P ₁	107	++	++	-	-
P ₂	102	+++	++	++	++
Troponin-T					
T ₁	52	++	++	++	++
T ₂	50	+	+	++	++
T ₄	46	+++	+++	+	+
Aktin A	44	+++	++	+++	+++
C, D spezifische Bande ?	43	-	-	+	+
Tropomyosin TM	41	+++	+++	+++	+++
Banden-Bereich (Kinasen?)	35-31	+	-	++	++
Troponin-I					
I ₁	28	++	-	++	++
I ₂	27	++	++	++	++
Myosin					
LC ₁	24	+++	+++	+++	+++
LC ₂	22	+++	+++	-	-
LC ₃	21	+	+	++	++
LC ₄	19	+	+	+	+

- = keine detektierbare Proteinbande

+ = wenig ausgeprägte Proteinbande

++ = durchschnittlich ausgeprägte Proteinbande

+++ = stark ausgeprägte Proteinbande

3.1 Typ A-Fasern exprimieren unabhängig von ihrer Lage identische Proteinbanden

A-Fasern aus dem apodemalen und dem tergalen $c2$ -Anteil haben ein identisches Proteinmuster. Beim direkten Vergleich der Proteinbanden isolierter A-Fasern der beiden $c2$ -Anteile eines Vorderbeins im Gel von **Abb. 9** wird diese Übereinstimmung sehr deutlich. **Abbildung 10** widmet sich dem Vorderbein-Hinterbein-Vergleich der Proteine in A- und C/D-Fasern des 1. und 4. Beines. Die Proteinbanden der A-Fasern aus dem Vorderbeinmuskel (A_1) sind ebenfalls mit denen aus dem Hinterbeinmuskel (A_4) identisch. Beim Vergleich der C/D-Fasern aus dem Vorderbeinmuskel (C/D_1) mit denen des Hinterbeinmuskels (C/D_4) liegt auch eine Übereinstimmung im Proteinmuster vor, bis auf eine Proteinbande im 27-kDa-Bereich (Troponin-I), die bei dem Vorderbeinmuskel zusätzlich auftritt und dem Hinterbeinmuskel fehlt.

3.2 Das Färbeverfahren beeinflusst das Muster der Proteinbanden im Gel

Für die leichten Ketten des Myosins und für die Troponin-I-Isoformen erhielt ich bei Muskelfaserproben eines zweiten Tieres und mit einem anderen Färbeverfahren (Coomassie-Brilliant-Blue statt Silbernitrat) etwas andere Muster der Isoformen als zuvor beschrieben. **Abbildungen 9 und 10** zeigen Gele, die einer Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung unterzogen wurden. Die leichtere der Troponin-I-Doppelbanden, I_2 bei 27 kDa, tritt bei den A_{apo} und A_{terg} und den C/D_1 -Fasern nur schwach auf. Für die Myosin-LC-Isoformen gilt, dass die 24-kDa-Isoform zwar bei den A- und C/D-Fasern vorhanden ist, jedoch bei den C/D_4 -Fasern als Doppelbande (**Abb. 10**). Die 22-KDa-Bande ist nicht nur bei den A-Fasern vorhanden, sondern auch bei den C/D-Fasern, dort jedoch geringfügig leichter (21,5 KDa). Außerdem ließ sich die schmale 43-kDa-Bande, die spezifisch bei den C/D-Fasern vorkam, hier nicht mehr ausmachen oder wurde vom exprimierten Aktin verdeckt. Erstmals waren unter diesen Versuchsbedingungen bei den C/D-Fasern im niedermolekularen Bereich bei 17 und 18 kDa

Proteinbanden erkennbar, die den A-Fasern fehlen (**Abb. 10** bei C/D₁ und C/D₄) und die aufgrund ihrer molekularen Masse als Troponin-C angesprochen werden können. Inwieweit es sich hier eventuell um ein methodisch bedingtes Anfärbeverhalten der Proteinbanden handelt, wird weiter unten diskutiert (siehe Diskussion I. 4.).

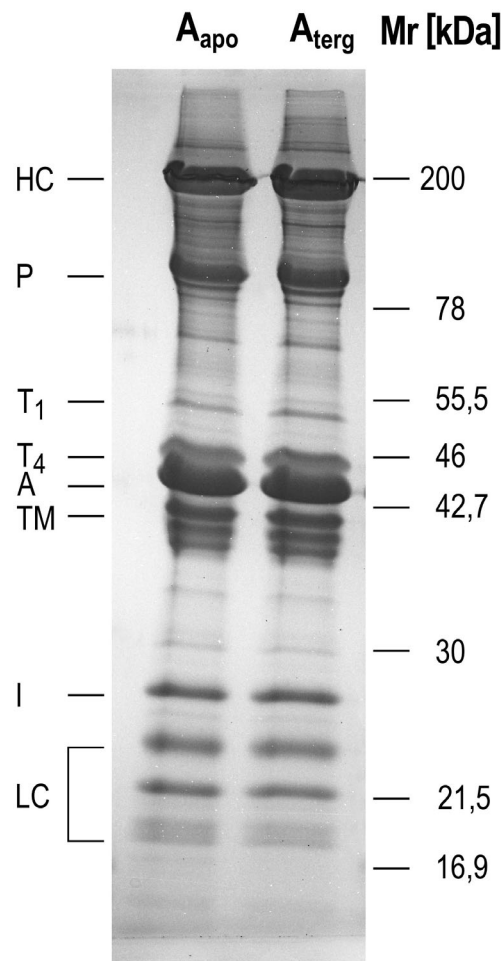


Abb. 9 Vergleich der Polypeptidmuster isolierter A-Fasern aus dem apodemalen (*A_{apo}*) und dem tergalen (*A_{terg}*) c2-Anteil; SDS-PAGE (15% Gel); Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung; Auffällig ist die große Übereinstimmung des Proteinspektrums und die prominente Bande des 46-KDa-Proteins (*T₄*) bei den A-Fasern beider c2-Anteile. Proteinbestimmung erfolgte nach Schaffner und Weissmann (1973). Links: Beschriftung potentieller Proteinkandidaten (siehe Abkürzungsliste). Rechts: molekulare Massen (*Mr*) der Hauptkomponenten der Standardproteingemische (*Rbl*, *Rbh*, *StIV* und *StVIII*)

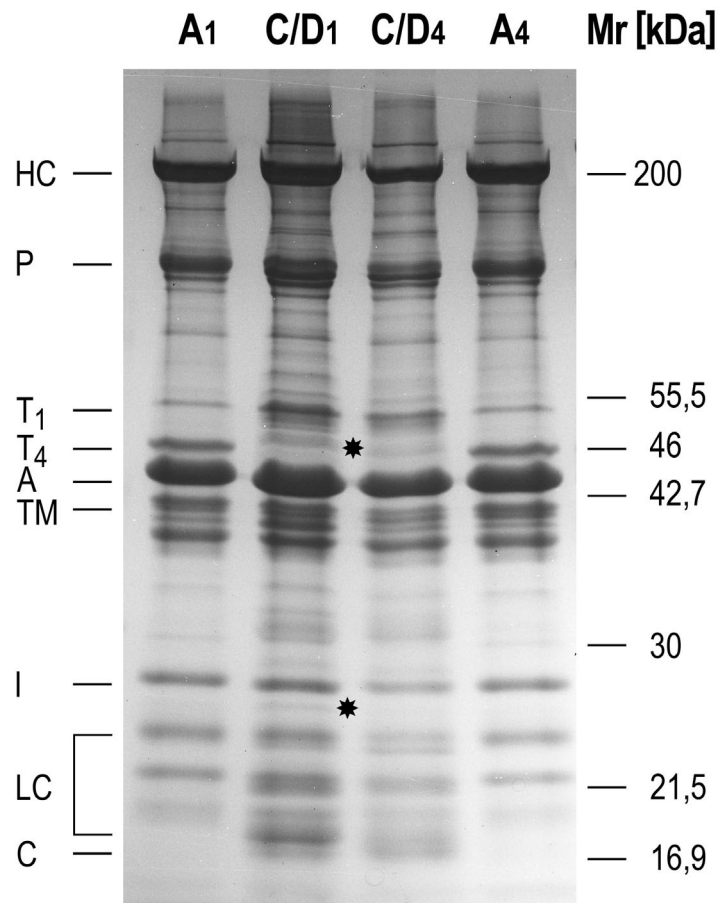


Abb. 10 Vergleich der Polypeptidmuster isolierter *A* und *C/D*-Fasern aus einem *c2*-Muskel eines Vorder- (*A_I* und *C/D_I*) mit dem eines Hinterbeines (*A₄* und *C/D₄*); SDS-PAGE (15 % Gel); Coomassie-Brilliant-Blue Färbung. Das Proteinmuster der *A_I*-Fasern ist mit dem der *A₄*-Fasern identisch. Die *C/D_I*-Fasern unterscheiden sich im 50-kDa-Bereich und bei ca. 27 kDa von den *C/D₄*-Fasern, indem sie in diesen Bereichen vermehrt Banden aufweisen (Sternchen). Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (1973). Links: Abkürzungen für mögliche Proteinkandidaten (siehe Liste). Rechts: molekulare Massen (*Mr*) der Hauptkomponenten der Standardproteingemische (*Rbl*, *StIV* und *StVIII*)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Proteinspektrum der A- und B-Fasern von dem der C- und C/D-Fasern typisch in spezifischen Isoformen (des Paramyosins, des Troponinkomplexes und der leichten Ketten des Myosins) voneinander unterscheidet. Bis auf eine Troponin-I-Bande der C/D-Fasern im Vorderbeinmuskel kommen keine lagespezifischen Unterschiede (tergaler versus apodemaler Anteil, Vorder- versus Hinterbein) im Proteinmuster vor. Die Isoformen stehen jeweils in einem funktionellem Zusammenhang mit der Fasermechanik (Diskussion I. 4.).

separate Erklärung der Abkürzungen für Tabelle 6 und Abb. 7–10

Muskelfasertypen (= waagerechte Beschriftung in den Abbildungen):

- A:** Fasertyp A
- A₁:** Fasertyp A aus Vorderbein-*c2*-Muskel
- A₄:** Fasertyp A aus Hinterbein-*c2*-Muskel
- A_{apo}:** Fasertyp A aus apodemalem *c2*-Anteil
- A_{terg}:** Fasertyp A aus tergaem *c2*-Anteil
- B:** Fasertyp B
- C:** Fasertyp C
- C/D₁:** Fasertyp C und D aus Vorderbein *c2*-Muskel
- C/D₄:** Fasertyp C und D aus Hinterbein *c2*-Muskel
- D:** Fasertyp D

Proteine (= senkrechte Beschriftung in den Abbildungen):

- A:** Aktin
- C:** Troponin-C (C für Ca²⁺-bindend)
- HC:** Myosin heavy chain
- I :** Troponin-I (I für ATPase-inhibierend)
- I_{1,2}:** Isoformen von Troponin-I
- kDa:** Kilo-Dalton
- LC :** Myosin light chain
- LC₁₋₄:** Isoformen der Myosin light chain
- Mr :** molekulare Masse
- P:** Paramyosin
- P_{1,2}:** Isoformen von Paramyosin
- Rbl:** Rainbow low, Standard der Firma Biometra®
- StIV:** Standard IV der Firma Merck®
- StVIII:** Standard VIII der Firma Merck®
- T:** Troponin-T (T für Tropomyosin-bindend)
- T_{1,2,4}:** Isoformen von Troponin-T
- TM:** Tropomyosin

III. Innervation des *c2*-Muskels

Die Innervation der Arthropodenmuskulatur erfolgt über zahlreiche synaptische Kontakte (*multiterminal*) in der Regel durch mehrere Motoneuronen (*polyneural*). Die Wirkung auf die Muskelfaser kann sowohl erregend als auch hemmend sein. Es stellte sich die Frage nach Anzahl und Art der den *c2*-Muskel innervierenden Motoneuronen. Bislang konnten 2 Motoneurone, die den *c2*-Muskel innervieren, elektrophysiologisch charakterisiert werden (Milde und Seyfarth 1988; Kadel 2002). Folgende Fragen sollten untersucht werden:

- Wie groß ist die Gesamtzahl der den *c2*-Muskel innervierenden Motoneurone?
- Wo verlaufen die motorischen Axone?
- Wo liegen die zentralen Projektionsareale der Motoneurone?
- Finden sich Unterschiede der Ergebnisse im Vorderbein- Hinterbeinvergleich und gibt es innerhalb der Neurone auch mögliche „Kandidaten“ für eine inhibitorische Innervation?

1. Der *c2*-Muskel der Vorder- und Hinterbeine wird durch einen separaten Nerv innerviert

Der *c2*-Muskel eines jeden Beines wird von einem eigenen Nervenast aus dem entsprechenden Beinneuromer versorgt. Der genaue Nervverlauf kann in schematisch skizzierten Frontalschnitten durch das Prosoma-Coxa-Gelenk eines Vorder- und Hinterbeines verfolgt werden (rot in **Abb. 11**). Zu Beginn sind die Verhältnisse im Vorder- und Hinterbein ähnlich. Der Nerv verläuft zunächst jeweils bandförmig zwischen den Ansatzstellen von *c1*, dem anterioren Coxadepressor, und *c2*. Dabei wird je ein dünner Nervenast zu *c1* gesandt. Im Hinterbein (**Abb. 11b**) teilt sich der verbliebene Nervenstrang dahinter in einen dickeren und einen dünneren Ast auf. Der dickere Ast versorgt kurz nach der Aufzweigung den *c2*-Muskel, während der dünnere die Lateralmuskulatur innerviert. Im Vorderbein (**Abb. 11a**) zweigt sich der *c2*-Nerv nach dem Abzweig zur Lateralmuskulatur in vier Äste auf: zwei schmale, die den apodemalen Anteil versorgen und zwei breite, die den tergalen *c2*-Anteil innervieren. Der den

c2-Muskel innervierende Nervenanteil verläuft eine kurze Strecke oberflächlich und verlagert sich dann ins Muskelinnere. Wie sich der *c2*-Nerv, unter Abspaltung mehrerer Seitenarme, im Muskelinnern weiter verzweigt, zeigt **Abb. 11c**: Die Seitenarme des Nerven umgreifen das zentrale Muskelbündel und zweigen sich nochmal dorsal- und ventralwärts auf.

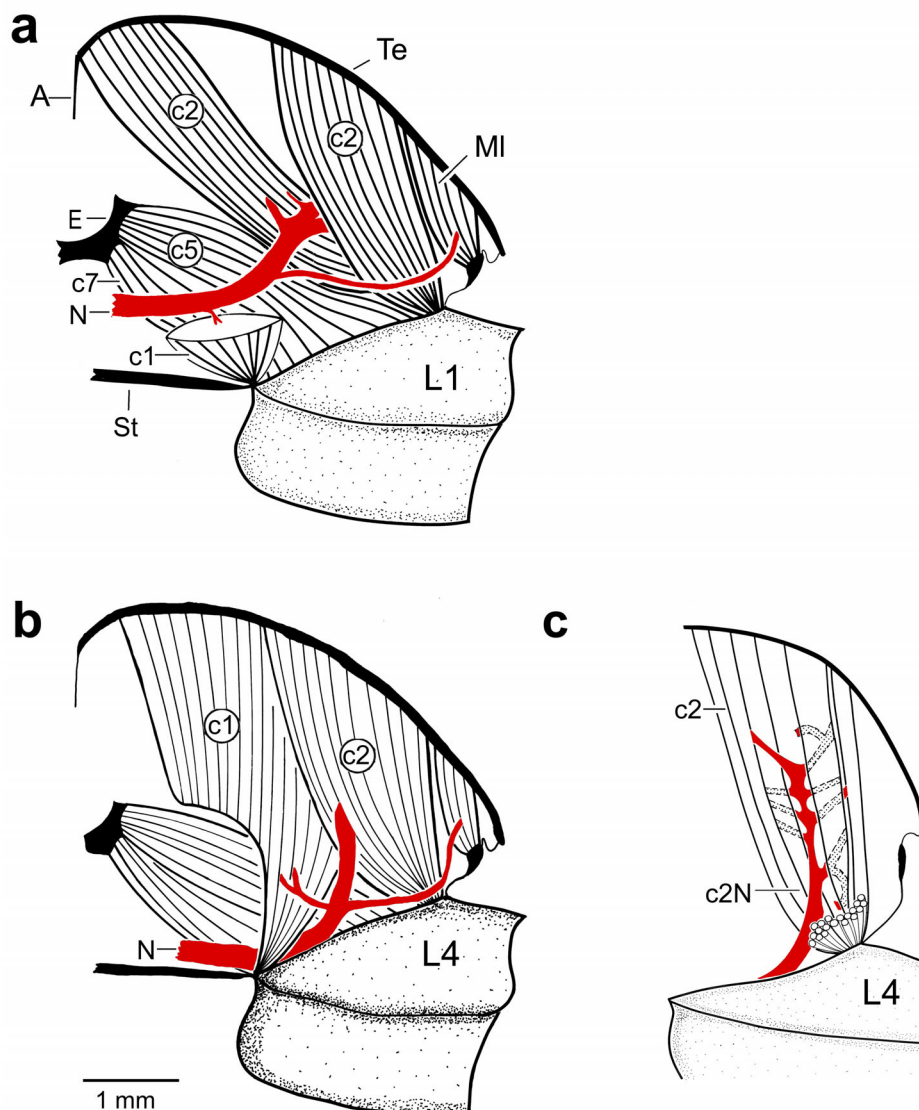


Abb. 11 Darstellung der Innervation des *c2*-Muskels in den Vorder- und Hinterbeinen in anteriorer Ansicht. *c2* wird jeweils durch einen separaten Nerv innerviert. **(a)** linkes Vorderbein (*L1*): der Nerv verläuft zwischen den endosternalen Muskeln *c5* und *c7* und dem anterioren Coxadepressor *c1* (Anschnitt), der einen kleinen gegabelten Abzweig erhält. Je 2 Nervenäste innervieren den apodemalen und tergalen *c2*-Anteil. **(b)** Hinterbein (*L4*): *c1* und die Lateralmuskulatur erhalten wieder je einen Nervenabzweig, bevor der Nerv den hier ungeteilten *c2*-Muskel innerviert. **(c)** Verlauf des Nerven nach Eintritt in *c2* von *L4* (*c1* und Lateralmuskulatur sowie einige Typ-*A* und *B*-Fasern sind entfernt). *N*: Nerv; *MI*: Lateralmuskulatur; *c2N*: *c2*-Nerv

2. Der *c2*-Muskel der Vorder- und Hinterbeine wird polyneural innerviert

Retrograde Anfüllungen der *c2*-Nerven der Vorder- und Hinterbeine lassen auf eine Innervation des Muskels durch insgesamt sechs Motoneurone schließen. Verschiedene Tracersubstanzen in mehreren Präparaten ergaben allerdings unterschiedliche Zahlen von Somata im ZNS. Die **Tabellen 7** (Vorderbein) und **8** (Hinterbein) fassen diese Ergebnisse zusammen. Am häufigsten (in 12 von 31 Präparaten) fand sich die Situation mit sechs markierten Motoneuronen mit folgender Anordnung der Somata: Fünf Somata liegen im ipsilateralen Beinneuromer (also in dem Beinneuromer, welches dem Bein zugeordnet ist, an dem die Nervenfüllung vorgenommen wurde) und eines in dem Beinneuromer anterior dazu.

Tabelle 7 Vorderbeine: Der *c2*-Muskel wird wahrscheinlich durch 6 Motoneurone (diese Fälle sind farblich gekennzeichnet) innerviert. Anzahl und Ort markierter Somata im ZNS nach selektiven Füllungen („Backfills“) des *c2*-Nerven mit verschiedenen Tracern und Laufzeiten. Cobalt (Co), Nickelchlorid (NiCl₂)

Spinne	Tracer in <i>c2</i> -Nerv Vorderbein	Laufzeit	Anzahl markierter Somata / Beinneuromer			Σ Somata
			ipsilateral		kontralateral	
			Pedipalpenneuromer	1. Beinneuromer	1. Beinneuromer	
#1	NiCl ₂	19 h	1	4		5
#2	NiCl ₂	18 h	1	5		6
#3	NiCl ₂	19 h		1		1
#4	NiCl ₂	17 h		1		1
#5	NiCl ₂	22 h		3		3
#6	CoLysin	20 h		3		3
#7	CoLysin	15 h		2		2
#8	GABA + NiCl ₂	18 h		4	1	5
#9	GABA + NiCl ₂	20 h	1	5		6
#10	GABA + NiCl ₂	21 h	1	4		5
#11	GABA + NiCl ₂	22 h	1	5		6

Tabelle 8 Hinterbeine: auch hier wird der *c2*-Muskel wahrscheinlich durch 6 Motoneurone innerviert (am häufigsten, in 40 % der Präparate, wurden 6 Motoneurone markiert; Somataanzahl farblich gekennzeichnet). Anzahl und Ort markierter Somata im ZNS nach selektiven Füllungen („Backfills“) des *c2*-Nerven mit verschiedenen Tracern und Laufzeiten.

Spinne	Tracer in <i>c2</i> -Nerv Hinterbein	Laufzeit	Anzahl markierter Somata/ Beinneuromer				Σ Somata
			ipsilateral			kontralateral	
			3. Bein- neuromer	4. Bein- neuromer	Abdominal- neuromer	4. Bein- neuromer	
#12	NiCl ₂	24 h		1			1
#13	NiCl ₂	24 h	1	3			4
#14	NiCl ₂	20 h		1			1
#15	NiCl ₂	19 h		2			2
#16	NiCl ₂	22 h	1	7	1		9
#17	NiCl ₂	21 h		3			3
#18	NiCl ₂	15 h	1	5			6
#19	NiCl ₂	14 h		2			2
#20	NiCl ₂	17 h	1	5			6
#21	NiCl ₂	16 h	1	5			6
#22	NiCl ₂	16 h		10			10
#23	Biocytin	14 h	1	5			6
#24	Biocytin	6,5 h		6			6
#25	Biocytin	1,5 h	1	7	1	1	11
#26	Biocytin	1,5 h	1	5			6
#27	GABA + NiCl ₂	19 h	1	5			6
#28	GABA + NiCl ₂	17 h	1	5			6
#29	GABA + NiCl ₂	20 h	1	7			8
#30	GABA + NiCl ₂	21 h	1	6			7
#31	GABA + NiCl ₂	22 h	1	5			6

Vorderbeinsituation: Am häufigsten (27 % der Präparate; **Tabelle 7**) wurden hier 5 bzw. 6 Motoneuronen markiert. **Abbildung 12a** zeigt die Projektionen von 6 Motoneuronen im fusionierten Unterschlundganglion als Rekonstruktion aus Horizontalschnitten des ZNS. Die Somata der Motoneurone gruppieren sich als tropfenförmige Zellkörper in der ventralen Rinde am vorderseitigen Septum, nahe der Mittellinie. Fünf liegen im ipsilateralen 1. Beinneuromer und eines im anterior gelegenen Pedipalpenneuromer. Die Somata entsenden ihre Primärneurite gebündelt dorsal- und distalwärts. Die dendritischen Verzweigungen beschränken sich auf den dorsalen Bereich des 1. Beinneuromers und decken dort hauptsächlich den posterioren Bereich ab. Die Axone verlaufen parallel zum vorderseitigen Septum und verlassen das Beinneuromer im *c2*-Nerv. In einem einzigen Präparat wurde ein Soma im kontralateralen 1. Beinneuromer markiert. In keinem wurden mehr als 6 Motoneurone angefärbt.

Hinterbeinsituation: In den meisten Präparaten (9 von 20 = 45 %, siehe **Tabelle 8**) wurden auch hier 6 Motoneurone markiert. Die **Abb. 12b, c** stellen horizontale bzw. sagittale Rekonstruktionen der Motoneurone dar. Fünf ihrer Somata liegen im ipsilateralen Hinterbeinneuromer und eines im 3. Beinneuromer davor. Die Somata liegen in der ventralen Cortexschicht am vorderseitigen Septum, entsenden senkrecht nach oben ziehende Neurite und projizieren bis in die dorsalsten Schichten. In einem Fall wurde ein Soma im kontralateralen 4. Beinneuromer markiert. Zweimal wurde je ein Soma im ipsilateralen Abdominalneuromer angefärbt. Es kamen auch Anfüllungen vor, in denen mehr als 6 Neurone markiert wurden. Das Maximum betrug 11 Somata, unter Verwendung von Biocytin. Hierbei könnte es sich um methodisch bedingte Artefakte durch lange Laufzeiten, wie z. B. Lecks in der Zellmembran handeln. Dadurch können benachbarte Fasern die Tracersubstanzen aufnehmen und weitertransportieren („Dye-coupling“).

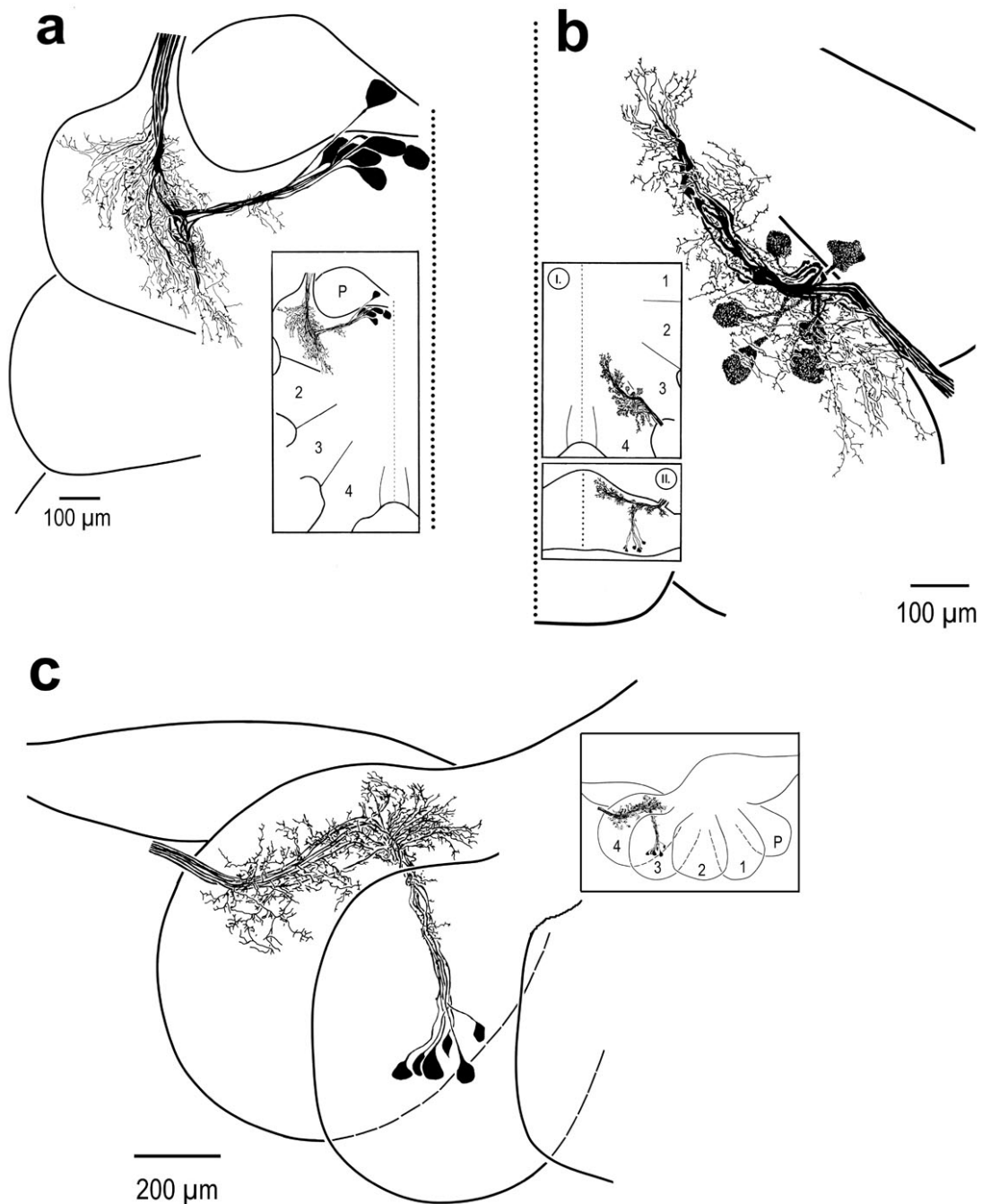


Abb. 12 Rekonstruktionen von Projektionen im Unterschlundganglion nach retrograden NiCl_2 - und CoCl_2 -Anfüllungen des $c2$ -Nerven. Der $c2$ -Muskel wird durch 6 Motoneurone innerviert. **(a)** Vorderbein, horizontal: 5 der Somata liegen im 1. und eines im Pedipalpenneuromer (**P**). **Inset:** Lage der Neurone im fusionierten Unterschlundganglion mit Mittellinie (gepunktet) und septalen Neuromergrenzen. **(b)** Hinterbein, horizontal: 5 Somata liegen im 4. und eines im 3. Beinneuromer. **Inset I:** Lage im fusionierten Unterschlundganglion, Dorsalansicht. **Inset II:** Frontalansicht, die Somata liegen ventral in der Rindenschicht, die dendritischen Aufzweigungen sind auf dorsales Neuropil beschränkt. **(c)** Sagittalansicht: Die Somata im Hinterbeinneuromer entlassen steil nach dorsal steigende Neurite und projizieren bis in dorsalste Schichten des ipsilateralen Beinneuromers. Die Axone verlassen parallel als $c2$ -Nerv das Beinganglion. **Inset:** räumliche Übersicht der Motoneurone im Unterschlundganglion. **P:** Pedipalpenneuromer; **1, 2, 3, 4:** 1.–4. Beinneuromer.

3. Zwei der Motoneurone, die den *c2*-Muskel innervieren, sind positiv GABA-immunreaktiv

Serien-Semidünnschnitte des *c2*-Nerven nahe seinem Eintritt in den Muskel beinhalten sowohl in der Vorder- als auch Hinterbeinsituation je 2 Axonprofile, die GABA-ähnliche Immunreaktivität aufweisen. Sie sind in den schematisierten Semidünnschnitten von **Abb. 13** als schwarze Axonprofile (1, 2) im *c2*-Nerv des Vorder- (R1) und Hinterbeins (L4) zu erkennen. Es handelt sich jeweils um ein kleines Axonprofil (1, mit 5–10 µm Durchmesser) und ein größeres (2, mit 10–20 µm Durchmesser). Zwischen beiden Axonprofilen liegt jeweils ein großer (40 µm) nicht immunreaktiver Axonquerschnitt. Axonprofil 1 ist in beiden Beinsituationen jeweils halb so groß wie das Axonprofil 2. Wie in **Abb. 13** zu erkennen, verläuft der Nerv im Vorderbein als schmales Band mit insgesamt 26 Profilen (7 große und 19 kleine). Im Hinterbein wirkt der Nervquerschnitt mehr gedrungen und enthält 18 Axonprofile (6 große und 12 kleine). Die überzähligen, kleinen Profile sind vermutlich (nicht-motorische) efferente Fasern, die periphere Sinnesorgane im Coxabereich versorgen (siehe Diskussion II. 1. Diskrepanz von Anzahl Motoneuronen und Axonquerschnitten).

Insgesamt zeigt sich, dass der *c2*-Muskel in Vorder- und Hinterbeinen polyneural innerviert wird, höchstwahrscheinlich durch sechs Motoneurone. Zwei davon sind jeweils GABA-immunreaktiv, ein Hinweis auf eine mögliche inhibitorische Innervation des *c2*-Muskels.

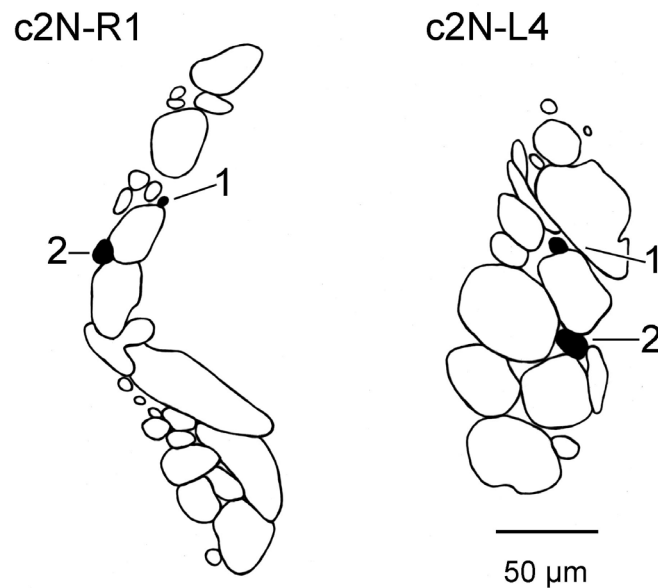


Abb. 13 Schematisierte Querschnitte durch den *c2*-Nerven (*c2N*) eines rechten Vorder- (*R1*) und linken Hinterbeines (*L4*) nahe dem Eintritt in den Muskel. Rekonstruktionen aus Semidünnschnitten, die mit einem Serum gegen GABA markiert wurden. Der Nerv enthält jeweils zwei GABA-immunpositive (schwarz) Axonprofile (*1* und *2*).

IV. Aktivität des *c2*-Muskels in ausgewählten Verhaltensweisen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigt *Cupiennius salei* sowohl in freier Natur als auch im Labor die reflexartige Verhaltensweise des Körperanhebens. Myogramableitungen der *c2*-Aktivität in mehreren Beinen (Eckweiler 1987; Eckweiler und Seyfarth 1988) zeigten, dass der *c2*-Muskel regelmäßig beim Körperanheben und bei Laufen aktiv ist.

Das Körperanhebeverhalten ist ein geeignetes Modell zur Aufklärung der am Reflexbogen beteiligten Verschaltungen im ZNS und in der Peripherie. Meine eigenen Experimente hierzu konzentrieren sich auf die Frage, welche Rolle die einzelnen Fasergruppen und neuromuskulären Einheiten des *c2*-Muskels beim taktilen Körperanheben und darüberhinaus in ausgewählten Verhaltensweisen (Schreckreaktionen, schnelle und langsame Laufstarts) spielen.

Diese Versuche führte ich teilweise gemeinsam mit Michael Kadel durch, der sich ansonsten mit den zentralnervösen Korrelaten der Muskelreflexe beschäftigte (Kadel 1992; Seyfarth 2002).

1. Das Körperanhebeverhalten von *C. salei* besteht aus einer lokalen und plurisegmentalen Reaktion

Das Körperanhebeverhalten von *C. salei* besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Die Auslenkung ventraler Tastaare der Coxa führt zuerst allein zu einer *lokalen Reaktion* (Kontraktion) in dem *c2*-Muskel der gereizten Coxa. Diese *lokale Reaktion* hat unter „natürlichen Bedingungen“ (d. h. Spinnen auf der Kugel oder freilaufend) eine Auslenkung des Prosoma-Coxa-Gelenkes zur Folge, die dann sekundär (nach einer Latenz von 30–50 ms) auch eine *plurisegmentale Reaktion* in den *c2*-Muskeln aller anderen Beine nach sich zieht. Anders als diese koordinierte Reflexantwort aller 8 Beine in freilaufenden oder auf der Laufkugel befindlichen Spinnen, bleibt die Reflexaktivität in festgelegten, unbeweglichen Spinnen als *lokale Reaktion* allein auf das gereizte Bein beschränkt.

2. Wird die Coxa passiv bewegt, kann auch in festgelegten Spinnen eine plurisegmentale Reaktion aller 8 Beine ausgelöst werden

Welche Reizbedingungen führen im festgelegten Zustand einer Spinne zu einer Reflexantwort, die dem Körperanhebeverhalten unter freibeweglichen Bedingungen, also einer Reflexantwort in allen 8 Beinen („plurisegmentale Reaktion“), entspricht?

Die *plurisegmentale Reaktion* zeigt sich in festgelegten und damit immobilisierten Spinnen, wenn die Coxa eines Beines passiv bewegt wird. **Abbildung 14** zeigt die *c2*-Aktivität in einer auf einem Halter festgelegten Spinne. Die taktile Reizung ventraler Coxahaare des linken Hinterbeines führt zu einer lokalen Reaktion allein im *c2* des gereizten Beines (**Abb. 14a**) und nicht im kontralateralen Bein (R4). Erst ein passiver Bewegungsreiz

auf die Coxa des linken Hinterbeines ruft die plurisegmentale Reaktion auch im rechten Hinterbein hervor (**Abb. 14b**). Ausschaltversuche ergaben, dass für das Zustandekommen der *plurisegmentalen Reaktion* interne Gelenkrezeptoren des Prosoma-Coxa-Gelenks verantwortlich sind (Kadel 1992) (siehe Anhang AII. Charakterisierung des internen Gelenkrezeptors R_0 , Punkt 1.).

3. *c2* aktiviert die gleichen neuromuskulären Einheiten bei der lokalen wie bei der plurisegmentalen Reaktion des Körperanhebens

Welche neuromuskulären Einheiten rekrutiert der *c2*-Muskel bei diesen beiden Reaktionen und in anderen Situationen (z. B. festgelegt versus freilaufend)? In extrazellulären, bipolaren Elektromyogrammen des *c2*-Muskels der Hinterbeine festgelegter Spinnen treten mindestens 3 exzitatorische neuromuskuläre Einheiten auf, die sich in ihrer Amplitude und ihrem Zeitverlauf voneinander unterscheiden. Diese Einheiten erscheinen sowohl nach dem taktilen Reiz auf Haarauslenkung bei der *lokalen* (**Abb. 14a**) als auch bei der *plurisegmentalen Reaktion* (**Abb. 14b**), die durch den Bewegungsreiz hervorgerufenen wird.

- Einheit „1“ zeigt einen relativ langsamen Potenzialverlauf mit geringer Amplitude.
- Einheit „2“ zeigt ebenfalls eine geringe Amplitude, aber einen schnelleren Verlauf.
- Einheit „3“ ist deutlich größer als die beiden anderen und zeigt den schnellsten Zeitverlauf.
- Daneben kommen noch Einheiten mit einer mittleren Amplitude vor.

In Schreckreaktionen, die nach kurzen Windreizen (anpusten der Spinne) erfolgen, werden zusätzlich zu den Einheiten „1“ bis „3“ noch mehrere schnelle Einheiten rekrutiert, die bei der lokalen und plurisegmentalen Reaktion nicht auftreten (**Abb. 14c, „F“**).

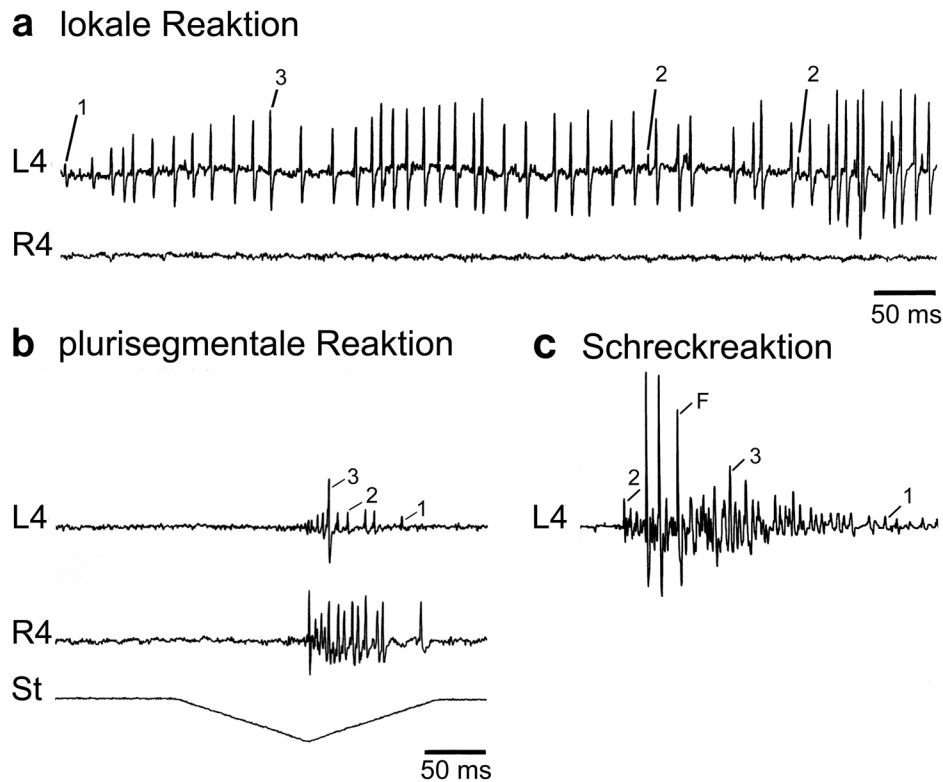
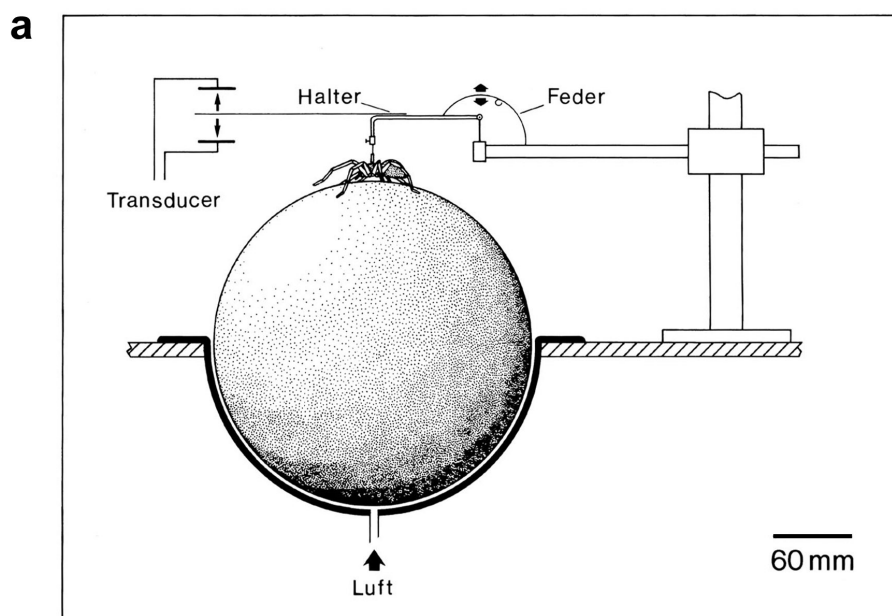
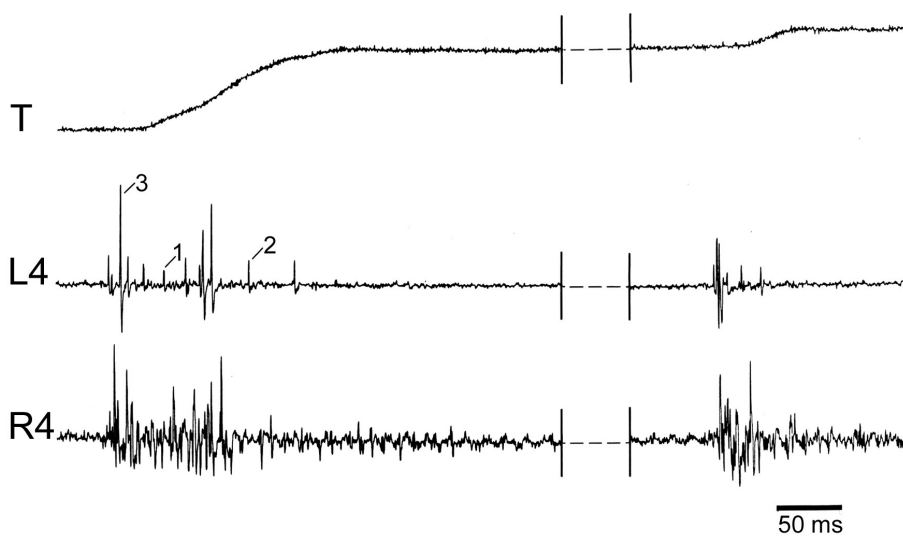


Abb. 14 Elektromyogramme des *c2*-Muskels der Hinterbeine (**L4**, **R4**) in verschiedenen Reizsituationen. Spinne jeweils auf Halter festgelegt. Der *c2*-Muskel rekrutiert jeweils die gleichen neuromuskulären Einheiten **1**, **2**, und **3**. **(a)** taktile Reizung, d. h. gezielte Auslenkung von Tasthaaren der ventralen Coxa von **L4** führt zur *lokalen Reaktion* im *c2*-Muskel des gereizten Beines. **(b)** Ein passiver Bewegungsreiz (**St**) auf die Coxa von **L4** führt zur *plurisegmentalen Reaktion* auch im *c2*-Muskel von **R4**. Es lassen sich die gleichen Einheiten identifizieren. **(c)** Nach einem kurzen Windreiz (Anblasen) reagiert die Spinne mit einer *Schreckreaktion*. *c2* rekrutiert zusätzlich zu **1**, **2**, und **3** noch schnelle Einheiten (**F**) mit hoher Amplitude.

Bei Spinnen, die sich auf der Kugel frei bewegen können, lassen sich die gleichen neuromuskulären Einheiten identifizieren, die auch im festgelegten Zustand rekrutiert wurden. Die Myogrammableitungen in **Abb. 15b** zeigen die *c2*-Aktivität der Hinterbeine beim Laufen auf der Kugel in zwei aufeinanderfolgenden plurisegmentalen Reaktionen. Gleichzeitig lässt sich in der Transducerspur die Veränderung der Körperhöhe ablesen. Es kommt auch zu lokalen Reaktionen allein in R4 ohne Körperhöhenverstellung (**Abb. 15c**).



b plurisegmentale Reaktion



c lokale Reaktion

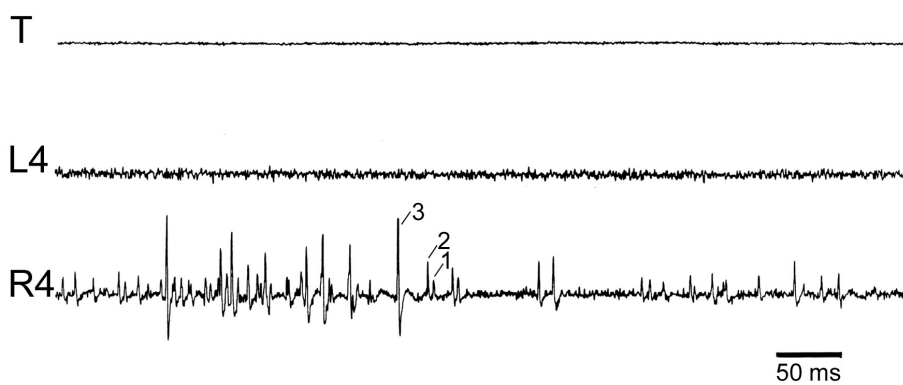


Abb. 15 Neuromuskuläre Einheiten bei einer freibeweglichen Spinne auf der Kugel (Legende auf der folgenden Seite)

Abb. 15 Elektromyogramme des *c2*-Muskels der Hinterbeine (**L4, R4**) freibeweglicher Spinnen auf der Kugel. **(a)** Versuchssituation der luftgelagerten Styroporkugel (Seyfarth 1985). Die Spinne wird mit einem Halter befestigt, dessen Eigengewicht durch eine Feder kompensiert wird. Ein kapazitiver Transducer (**T**) registriert die Körperhöhe. Der *c2*-Muskel rekrutiert bei beiden Reaktionen des Körperanhebens die gleichen neuromuskulären Einheiten **1, 2, 3**, vergleichbar mit denen im festgelegten Zustand (**Abb. 14**). **(b)** Zwei aufeinanderfolgende *plurisegmentale Reaktionen* im *c2*-Muskel des linken und rechten Hinterbeins nach sukzessiver Reizung ventraler Coxatasthaare von **L4**. Die Spinne hebt dabei jeweils ihren Körper an. **(c)** *Lokale Reaktion* beim stehenden Tier, ohne dass die Spinne ihre Körperhöhe verändert. Auch hier rekrutiert *c2* die neuromuskulären Einheiten **1–3**.

4. Der tergale *c2*-Anteil ist immer, der apodemale Anteil nur manchmal beim Körperanheben aktiv

Wie beteiligt sich der kleinere, apodemale Anteil des *c2*-Muskels der Vorderbeine am Körperanheben bzw. an der *lokalen* und *plurisegmentalen Reaktion*? Simultane Elektromyogramableitungen von beiden *c2*-Anteilen festgelegter Spinnen, wie in **Abb. 16** gezeigt, führen zu dem Ergebnis, dass der apodemale *c2*-Anteil nur in zwei Situationen aktiv ist:

- in der ersten *plurisegmentalen* Antwort bei mehreren aufeinanderfolgenden Bewegungsreizen (**Abb. 16b**),
- in Schreckreaktionen, die auf einen starken Windreiz folgen (**Abb. 16c**).

Bei der *lokalen Reaktion* hingegen, also nach nur taktiler Reizung, bleibt eine Antwort im apodemalen *c2*-Anteil aus, während der tergale Anteil aktiviert wird (**Abb. 16a**).

Abbildung 17 zeigt die Aktivität beider *c2*-Anteile bei langsamem und schnellem Körperanheben freibeweglicher Spinnen auf der Kugel. Der apodemale *c2*-Anteil ist nur zu Beginn des Körperanhebens aktiv, wenn dies schnell geschieht (**Abb. 17**, links). Wird die neue Körperhöhe dagegen langsam erreicht, bleibt die Aktivität des apodemalen Anteils aus (**Abb. 17**, rechts).

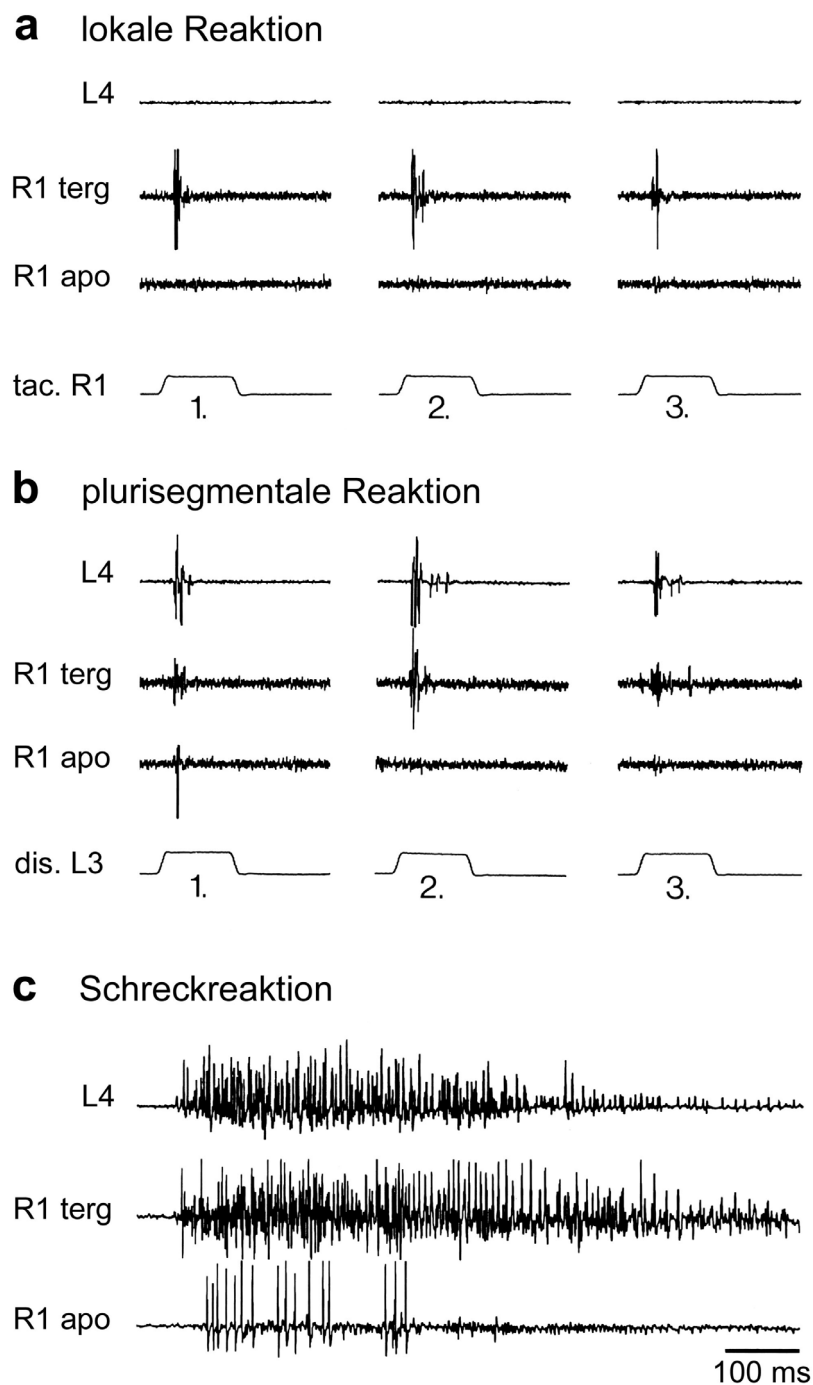


Abb. 16 Simultane Elektromyogramableitungen beider *c2*-Muskelanteile (*ter*: tergal, *apo*: apodemal) im rechten Vorderbein (*R1*) und des ungeteilten *c2*-Muskels im linken Hinterbein (*L4*) bei einer festgelegten Spinne. Der apodemale *c2*-Anteil ist nur zu Beginn der *plurisegmentalen Reaktion* und bei der *Schreckreaktion* aktiv. **(a)** Bei dreimaliger, sukzessiver Reizung (*tac R1*) coxaler Tastaare von *R1* erfolgt allein eine *lokale Reaktion* im tergalen *c2*-Anteil. **(b)** Wird die Coxa von *L3* passiv bewegt (*dis L3*), erfolgt zusätzlich in *R1terg* eine *plurisegmentale Reaktion*. Der apodemale *c2*-Anteil in *R1* ist allerdings nur bei dem ersten Reiz aktiv. **(c)** Bei der „Schreckreaktion“ der Spinne nach einem kräftigen Windreiz rekrutiert der apodemale *c2*-Anteil (*R1apo*) schnelle neuromuskuläre Einheiten.

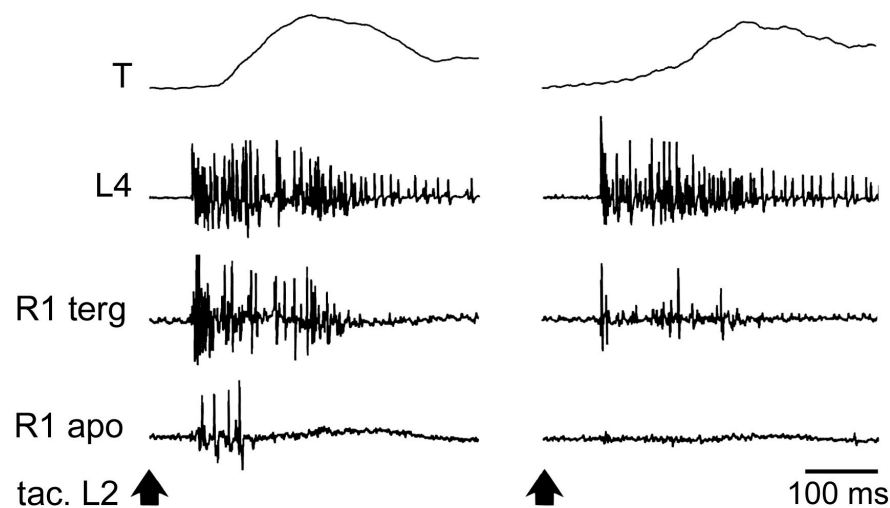


Abb. 17 Zwei Körperanhebereaktionen einer freibeweglichen Spinne auf der Kugel nach taktiler Reizung ventraler Coxahaare (*tac. L2*). Simultane Elektromyogramableitungen beider *c2*-Muskelanteile (*ter*: tergal, *apo*: apodemal) des rechten Vorderbeines (*R1*) und des ungeteilten *c2*-Muskels im linken Hinterbein (*L4*). Das Transducersignal (*T*) zeigt den Verlauf der Körperhöhe. Der Pfeil markiert jeweils den Reizbeginn. **Links**: Hebt die Spinne ihren Körper relativ schnell an (relativ steil verlaufendes Transducersignal), so ist der apodemale *c2*-Anteil kurz zu Beginn der *plurisegmentalen Reaktion* aktiv. **Rechts**: Diesmal erreicht die Spinne ihre neue Körperhöhe langsamer (flacher verlaufendes Transducersignal) und der apodemale Anteil ist nicht aktiv.

5. Der apodemale *c2*-Anteil der Vorderbeine ist zu Beginn von Schnellstarts der Spinne aktiv

Was die Körperhöhe anbelangt, beginnt *C. salei* ihre Laufphasen auf der Kugel unterschiedlich; entweder stellt sie langsam und stufenweise ihre neue Körperhöhe ein („Langsamstart“) oder aber sie startet schnell und stufenlos („Schnellstart“). Für beide Startformen zeigt **Abb. 18** jeweils ein Beispiel. Simultane Ableitungen aus beiden *c2*-Anteilen des rechten Vorderbeins und des ungeteilten *c2*-Muskels im rechten Hinterbein ermöglichen einen Vergleich der Muskel-Aktivitäten bei Veränderung der Körperhöhe (beachte Transducersignal). Es fällt auf, dass der apodemale *c2*-Anteil nur zu Beginn eines Schnellstarts (**Abb. 18b**) aktiv ist, also genau dann, wenn die Spinne ihren Körper schnell anhebt. Beim

langsamen und stufenweisen Körperanheben (**Abb. 18a**) bleibt die Aktivität des apodemalen Teils hingegen aus. Der tergale *c2*-Anteil des Vorderbeines und der *c2* des Hinterbeines sind während der gesamten Laufphase rhythmisch aktiv: anfangs bei beiden Startformen synchron, später auf derselben Körperseite alternierend.

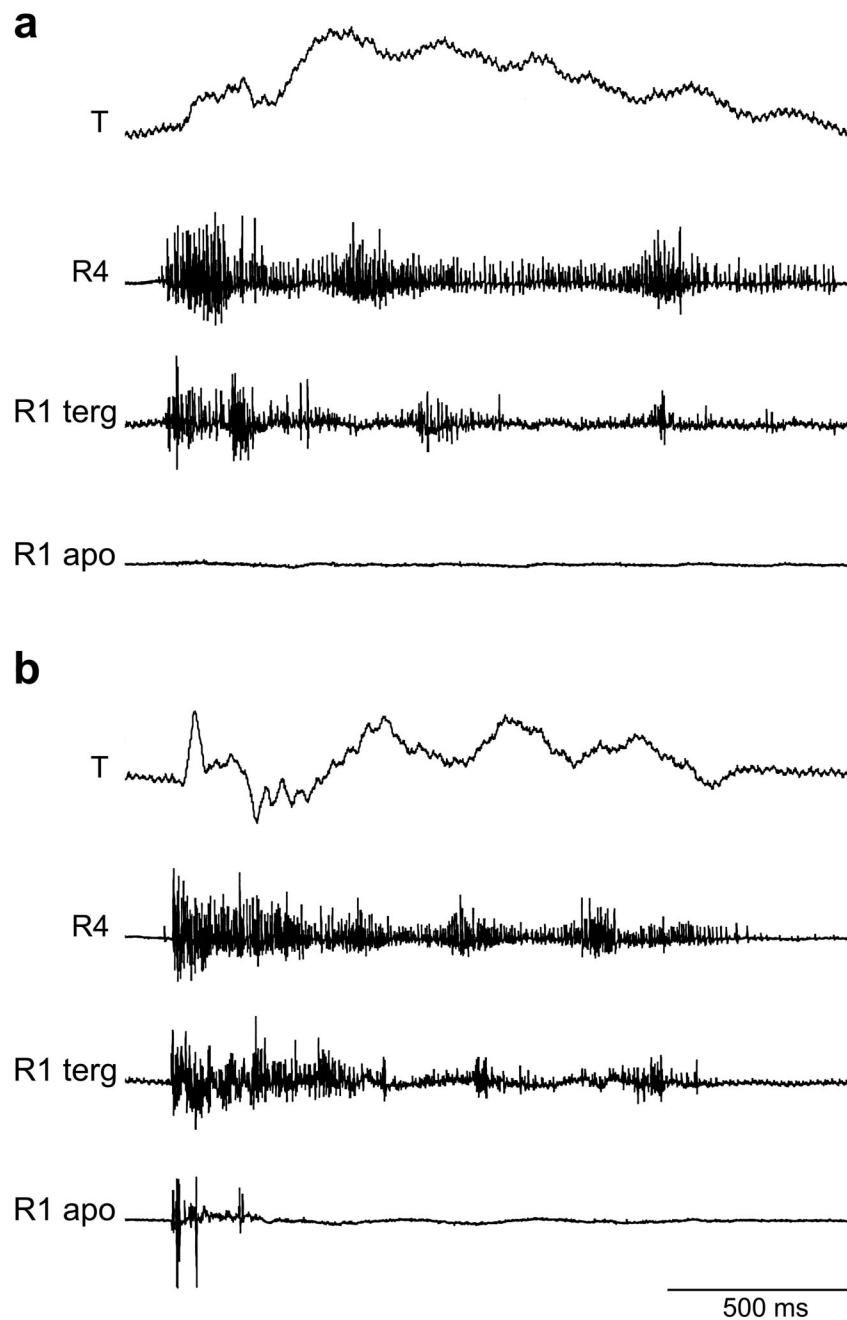


Abb. 18 Langsam- und Schnellstart einer Spinne auf der Kugel (Legende folgende Seite)

Abb. 18 Starten und Laufen einer freibeweglichen Spinne auf der Kugel. Simultane Elektromyogramableitungen beider *c2*-Muskelanteile (*ter*: tergal, *apo*: apodemal) im rechten Vorderbein (*R1*) und des *c2*-Muskels im linken Hinterbein (*L4*). Die Körperhöhe wird über einen kapazitiven Transducer (*T*) registriert. Die Art und Weise, wie *C. salei* eine Laufphase beginnt, entscheidet über die Aktivität des apodemalen Anteils. **(a)** Beim „Langsamstart“ mit stufigen Körperanheben bleibt die Aktivität des apodemalen Teils (*R1apo*) ganz aus. **(b)** Zu Beginn eines „Schnellstarts“ mit abruptem Körperanheben ist der apodemale *c2*-Anteil allerdings kurzzeitig aktiv. In der anschließenden Laufphase bleibt seine Aktivität aus. Der *c2*-Muskel im Hinterbein (*R4*) und der tergale Anteil des Vorderbeins (*R1terg*) werden dagegen in beiden Fällen während der gesamten Laufdauer jeweils rhythmisch rekrutiert.

Zusammenfassend ergibt sich: Das relativ stereotype Verhalten „Körperanheben“ wird durch eine lokale taktile Reaktion eingeleitet, auf die mit kurzer Latenz die koordinierte plurisegmentale Reaktion aller Beine folgt. In beiden Reaktionen rekrutiert Muskel *c2* die gleichen neuromuskulären Einheiten. Der apodemale *c2*-Anteil in den 3 Vorderbeinmuskeln ist allerdings nur an schnellen Bewegungsreaktionen beteiligt; sowohl bei schnellem Körperanheben als auch bei schnellen Laufstarts rekrutiert der apodemale Anteil mehrere phasische neuromuskuläre Einheiten.

Diskussion

Die wichtigsten Erkenntnisse zum *c2*-Muskel sind sein *heterogener Aufbau* aus 4 verschiedenen Fasergruppen und die Tatsache, dass er in den vorderen Beinpaaren *zweigeteilt* und im Hinterbeinpaar *einteilig* vorliegt. In allen Beinen wird er *polyneural*, vermutlich durch 6 Motoneurone, innerviert. Die Aktivität beider Muskelanteile der Vorderbeine an ausgewählten Bewegungsweisen der Spinne (Körperanheben, Laufen, Schreckreaktionen, Laufstarts) ist unterschiedlich.

I. Funktionelle Charakterisierung des *c2*-Muskels

Sowohl die *anatomische Kompartimentierung* des *c2*-Muskels in ein zentrales und peripheres Bündel als auch der *heterogene Aufbau* in vier Fasergruppen verschiedener Enzymaktivität, Sarkomerlänge und Proteine kann als Ausdruck einer vielseitigen „*funktionellen Arbeitsteilung*“ im Muskel gesehen werden. Die spezifische Ausstattung mit Enzymen, Glykogen und Proteinen bestimmt zusammen mit der zentralnervösen Ansteuerung über mehrere Motoneurone (siehe Punkt II.) den funktionellen Einsatz der Faserpopulationen im Verhalten der Spinne.

1. Welche unterschiedlichen Kontraktionsmodi resultieren aus den heterogenen Eigenschaften der Fasertypen?

Es folgt für jeden Fasertyp eine funktionelle Charakterisierung und eine Gegenüberstellung mit vergleichbaren Fasertypen im Krallenhebermuskel der Spinne und bei Vertebraten.

A-Fasern: Sie machen den Hauptanteil (77 % im Vorderbein und 63 % im Hinterbein) der Anschnittfläche aller Fasern im Muskel aus. Die A-Fasern des apodemalen Anteils sind die dicksten und längsten Fasern überhaupt. In ihren histochemischen Eigenschaften stimmen sie

mit den A-Fasern des tergalen Anteils und mit denen im Hinterbeinmuskel überein: Ihre gleichmäßig geringe SDH-Aktivität weist sie als mitochondrienarm aus und deutet somit auf eine niedrige Kapazität für oxidative Wege der Energiegewinnung hin. Ihr Stoffwechsel wird vorrangig anaerob/glykolytisch ablaufen. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Linzen und Gallowitz (1975), die ebenfalls auf sehr niedrige Aktivitäten mitochondrialer Enzyme in der Herz-, Prosoma- und Laufbeinmuskulatur von *C. salei* stießen. Die hohe ATPase-Aktivität charakterisiert die A-Fasern als schnell/phasisch kontrahierende Muskelfasern. Wie ihr niedriger Glykogengehalt nahelegt, sind A-Fasern aber auch schnell müde, also nicht für lang andauernde Kontraktionen geeignet.

Auch ihre gemeinsam mit den B-Fasern signifikant kürzere Sarkomerlänge gegenüber den zentralen C- und D-Fasern weist sie als die schneller kontrahierende Faserpopulation im *c2*-Muskel aus. In Muskelfasern verschiedener Beinmuskeln der Vogelspinne *Dugesiella hentzi* sind „sehr variable“ Sarkomerlängen gemessen worden; die Werte liegen zwischen 3,0 μm und 7,3 μm bzw. 2,8 μm und 5,6 μm (Zebe und Rathmayer 1968). Die Sarkomerlängen wurden hierbei aber keinem bestimmten Fasertyp zugeordnet, vielmehr wurden die Fasern als „einheitlich“ beschrieben. Ebenso nennen Sherman und Luff (1971) die Muskelfasern zweier Klauenmuskeln (Levator pretarsi und Depressor pretarsi) der Vogelspinne *Eurypelma marxi* „strukturell uniform“. Für die Sarkomerlängen der Levatorfasern geben sie durchschnittlich $3,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$, für die des Depressors $6,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$, an. In beiden Fällen sind die Faserpopulationen vermutlich nicht so homogen wie von den Autoren angenommen.

Die A-Fasern exprimieren zusätzlich die Paramyosin-P₁-Isoform (107 kDa). Dieses Faserprotein wird u. a. in Zusammenhang mit der Kraftentwicklung bei extremen reversiblen Längenänderungen der dicken Filamente diskutiert (siehe diese Kapitel Punkt 4.). Bei den schnellen Kontraktionen der A-Fasern sind solche Längenänderungen durchaus denkbar.

Die A-Fasern verfügen in ihrem Querschnitt über Sarkolemmgefaltungen 1. und 2. Ordnung (im Gegensatz zu ausschließlich 1. Ordnung bei den C und D-Fasern). Hierbei

handelt es sich um das bei Vertebraten und Invertebraten mit dem Extrazellularraum verbundene transversale tubuläre System (TTS). Im Faserinnern bildet es auch longitudinale Netzwerke, die wiederum mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Speichersystem, dem Sarkoplasmatischem Reticulum, in Verbindung stehen (Rüdel und Brenner 2000). Die Einfaltungen ermöglichen den dicken A-Fasern eine rasche Erregungsweiterleitung bis tief ins Innere der Muskelfaser. Bereits 1968 beschrieben Zebe und Rathmayer diese SarkolemmEinstülpungen 1. und 2. Ordnung als typisches Merkmal für Muskelfasern der intrinsischen Beinmuskulatur der Vogelspinne. Eisenberg (1985) nennt ein extensiv ausgebildetes T-System als Merkmal für schnell kontrahierende Muskelfasern in der Säugermuskulatur.

Zusammenfassend betrachtet korrespondieren die A-Fasern des *c2*-Muskels mit den A-Fasern des Krallenhebers von *C. salei* (Maier, Root und Seyfarth 1987), den Typ IV Fasern der Crustaceen (Rathmayer und Erxleben 1983; Rathmayer und Maier 1987; Gruhn und Rathmayer 2002) und mit den Zuckungsfasern der Vertebraten. Bei letzteren unterscheiden sich die Nomenklaturen je nach Autor, entweder wird der Stoffwechselweg oder die ATPase-Aktivität als Unterscheidungskriterium gewählt: FG (fast/glykolytisch) in Peter et al. (1972) und Weeks (1989) oder Typ IIB in Brooke und Kaiser (1970) und Pette und Staron (1993).

Es ist anzunehmen, dass A-Fasern hauptsächlich für schnelle und kurze Bewegungen z. B. zur Flucht und beim Beutefang, beim schnellen und ruckartigen Körperanheben, bei Schnellstarts und schnellem Laufen rekrutiert werden. Dies sind Situationen, in denen die Coxa schnell nach oben und/oder nach vorne bewegt werden muss (siehe Diskussion III. 3).

B-Fasern: Die B-Fasern des *c2*-Muskels sind den A-Fasern in ihren Dimensionen sehr ähnlich, nehmen allerdings insgesamt weniger Raum im *c2*-Muskel ein. Sie besitzen eine vergleichbare ATPase-Aktivität, zeigen jedoch jeweils mehr SDH-Aktivität und Glykogengehalt als die A-Fasern. Demnach wird ihr Stoffwechsel beide Wege für die Energiegewinnung

einschlagen können: die Glykolyse und den Citratzyklus. Sie sind dadurch nicht so schnell ermüdbar wie die A-Fasern und können somit zu länger anhaltenden Bewegungsabläufen beitragen oder aber in Notsituationen, wenn die A-Fasern bereits erschöpft sind, noch „zugeschaltet“ werden. Ihre ATPase-Aktivität, Sarkomerlänge und das ebenso gut ausgeprägte T-System wie bei den A-Fasern kennzeichnet sie als schnell bzw. phasisch kontrahierende Fasern. A- und B-Fasern bilden zusammen im peripheren Bündel des *c2*-Muskels einen funktionellen Verband. Die B-Fasern im *c2*-Muskel lassen etwas geringere SDH-Aktivität und etwas weniger Glykogengehalt als die B-Fasern des Krallenhebers von *C. salei* erkennen. Sie korrespondieren mit den Typ-II- oder -III-Fasern der Crustaceen (hier ist kein direkter Vergleich des Innervationsmusters und elektrophysiologischer Parameter möglich) (Rathmayer und Maier 1987), und dem FOG-Typ (fast-oxidativ-glykolytisch) (Peter et al. 1972) oder Typ IIA (Brooke und Kaiser 1970) der Vertebraten.

C-Fasern: Sie besitzen den höchsten Glykogengehalt und die größte SDH-Aktivität aller Fasern. Dies lässt auf einen glykolytisch und oxidativen Stoffwechsel und einen hohen Widerstand gegen Ermüdung schließen. C-Fasern werden über einen langen Zeitraum hinweg (tonisch) ihre Kontraktionen aufrecht erhalten können. Ihre mittlere ATPase-Aktivität liegt deutlich unter der der A-Fasern. Diese Tatsache, zusammen mit ihrer längeren Sarkomerlänge und ihrem wenig ausgeprägten T-System (nur Einstülpungen 1. Ordnung), deutet auf einen langsameren Kontraktionsmechanismus als bei den A- und B-Fasern hin. C-Fasern des *c2*-Muskels entsprechen in ihrer SDH-Aktivität und ihrem Glykogengehalt den C-Fasern des Krallenhebers. Allerdings ist ihre ATPase Aktivität geringer. Sie ähneln dem Typ II oder III der Krabbe (Vergleich des Innervationsmusters und elektrophysiologischer Parameter nicht möglich) (Rathmayer und Maier 1987) und dem FOG-Typ (fast-oxidativ-glykolytisch) (Peter et al. 1972) oder Typ IIA (Brooke und Kaiser 1970) der Vertebraten. Die Spinne wird die C-Fasern hauptsächlich für relativ langsame und kontinuierliche Bewegungen, wie zum Beispiel

beim Putzen oder bei Suchläufen, nutzen. C-Fasern sind für Haltearbeit gut ausgerüstet und kommen eventuell auch zum Aufrechterhalten einer erhöhten Körperposition bei Lauerstellungen oder beim Körperanheben der Spinne zum Einsatz.

D-Fasern: Sie stellen die Minderheit im zentralen Bündel dar. Ihre ATPase-Aktivität ist die geringste aller Fasertypen und weist zusammen mit ihren langen Sarkomerlängen und ihrem gering ausgeprägtem T-System auf einen langsamen Kontraktionsmodus hin. Der mittlere Glykogengehalt und die geringe SDH-Aktivität lassen auf einen anaerob/glykolytischen Stoffwechselweg schließen. Sie sind, wie auch die C-Fasern, für kontinuierliche und andauernde Bewegungen geeignet. Unter diesen Voraussetzungen bilden C- und D-Fasern einen funktionellen Verband im zentralen Bündel von *c2*. Die D-Fasern von *c2* entsprechen weitestgehend den D-Fasern des Krallenhebers, haben allerdings nicht so viel Glykogen wie diese. Bei Crustaceen und Vertebraten gibt es keine korrespondierenden Fasertypen mit den selben Eigenschaften. Innerhalb der Insekten kommt der Fasertyp I des Rotators der Coxa (M92) der Wanderheuschrecke dem D-Typ des *c2*-Muskels sehr nahe (Müller et al. 1992). Dieser erhält auch, genau wie die D-Fasern des Krallenhebers, doppelte Innervierung durch ein langsam erregendes und ein inhibierendes Neuron, in diesem Falle vom „common inhibitor“ (CI).

2. Welche Konsequenzen hat die Faserzusammensetzung auf das Laufen?

Ein Großteil der Beinmuskulatur von *C. salei* ist demnach für blitzartige, weniger für langanhaltende und kontinuierliche Aktionen ausgerüstet. Dieses Ergebnis passt gut zu früheren Beobachtungen (Videoaufzeichnungen) in Arenen, in der Natur und auch auf der Laufkugel, die zeigen, dass *C. salei* zu kurzen, schnellen Schrittfolgen mit nur wenigen Schritten neigt, gefolgt von Ruhepausen, in denen die Körper- und Beinstellung beibehalten wird (Seyfarth und Barth 1972; Linzen und Gallowitz 1975). Die Eigenschaft einer schnell

ermüdbaren „Kurzstreckenläuferin“ oder „Sprinterin“ teilt *C. salei* mit all ihren Spinnenverwandten; Spinnen laufen im allgemeinen nicht so lange Zeitspannen, wie sie von Insekten bewerkstelligt werden (Seyfarth 1985; Fröhlich 1978). Für die meisten Spinnen ist ein ruckhafter Lauf typisch (Foelix 1992; Baatrup und Bayley 1993).

Für die als „locomotory collapse“ (Wilson und Bullock 1973) bezeichnete, rasche Ermüdung bei Spinnen wird die ausgeprägte Mitochondrienarmut in der Muskulatur von *C. salei* (Linzen und Gallowitz 1975) und der schnelle Abbau von aerobem, energiereichen Phosphat verantwortlich gemacht. Das gesamte Faservolumen ist angefüllt mit dem kontraktilen Apparat, während der energiever sorgende Anteil „unterdrückt“ vorliegt (Linzen und Gallowitz 1975). Ein Beispiel für das andere Extrem, also einen Muskel, optimal angepasst an dauerhafte und kontinuierliche hohe Leistungen, ist der Flugmuskel der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*; hier machen sogenannte „Riesenmitochondrien“ knapp 40 % des Faservolumens aus (Sogl, Gellissen und Wiesner 2000). Für *C. salei* besteht allerdings auch gar nicht die Notwendigkeit, die Muskulatur für eine Langstreckenläuferin zu entwickeln. Barth (2001) fasst die Ergebnisse von Melchers (1967) Filmaufnahmen zum Beutefang von *C. salei* zusammen; demnach genügen der Spinne in der freien Natur kurze Attacken (200–700 ms), um in ihrem Nahbereich Beute zu machen oder aber vor Angreifern zu flüchten. Dabei kann das 1. und 2. Vorderbeinpaar Geschwindigkeiten von 3–4 m/s erreichen.

Nach der These Weinsteins und Fulls (1992) erhöht das Sich-Fortbewegen mit zeitweiligen Unterbrechungen insgesamt die Ausdauer eines Organismus. Die Notwendigkeit von Laufpausen bestimmter Dauer, wird bei Krabben der Spezies *Ocypode quadrata* in direkten Zusammenhang mit dem zu erfolgenden Laktat-(Milchsäure)abbau im Bein gebracht. Dieses entsteht beim anaeroben Abbau von Glykogen. Eine über ein bestimmtes Maß ansteigende Laktatkonzentration hemmt über eine pH-Ansäuerung das Schrittmacherenzym der Glykolyse und somit die anaerobe ATP-Resynthese (http://www.fitnesstribune.ch/arc/ift65_3.html). Die Tatsache, dass die anaerobe ATP-Resynthese viel schneller Energie liefert als die aerobe

Resynthese durch die Oxidation von Kohlehydraten, spricht ebenfalls für die Funktion der A-Fasern als kurz und schnell kontrahierende Fasern, die vor allem für rasche Beinbewegungen beim schnellen Laufen und Flüchten benutzt werden; für kurze Zeit wird schnell ein Maximum an Energie bereitgestellt. Für längere Läufe mit geringerer Geschwindigkeit könnten vor allem die glykogenhaltigen B-Fasern rekrutiert werden, die im *c2*-Muskel die zweithäufigste Fasergruppe darstellen. Nachteil ist allerdings die zeitliche und mengenmäßige Limitierung der anaeroben Energiegewinnung – aufgrund des beschränkten Glykogendepots – welche die Spinne nach kurzen Sprints immer wieder zum Anhalten („Ermüdung“) zwingt.

3. Mechanische Messungen typisierter *c2*-Muskelfasern geben Aufschluss über deren Kontraktionsmodus

Stefan Galler führte vereinzelte mechanische Experimente an typisierten *c2*-Muskelfasern durch (Bickeböller, Galler und Seyfarth 1989). Sie bestätigten die unter Punkt 1. genannten Schlussfolgerungen.

Querbrückensynchronisation: Eine A-Faser aus der *c2*-Peripherie zeigte 10fach kürzere Zeitkonstanten der Kraftverläufe („quick tension recovery“ 7 ms) als eine Faser aus dem zentralen Bündel („quick tension recovery“ 73 ms). Dies deutet auf wesentlich schnellere (Faktor 10) Querbrückenzyklen der A-Faser und damit auf einen schnelleren Kontraktionsmodus hin.

Ca²⁺-abhängige Spannungsentwicklung: Zentrale C/D-Fasern (N = 1, n = 15) zeigten eine höhere [Ca²⁺]-Sensitivität als periphere A/B-Fasern (n = 8). C/D-Fasern erreichen 50 % der maximalen Spannung bei pCa 5,42 ± 0,13 und A/B-Fasern bei pCa von 5,07 ± 0,05 (pCa = -log[Ca²⁺]). Ein Maß für die Kooperativität einer Ca²⁺-Bindung ist der Hill-Koeffizient (Rüegg 1986). Periphere A/B-Fasern haben einen höheren Hill-Koeffizienten (4,2) als zentrale C/D-Fasern (2,5). Auch diese mechanischen Experimente charakterisieren die A/B-

Fasern als phasisch und die C/D-Fasern als tonisch kontrahierende Fasern; denn in der Regel weisen schnelle Muskelfasern größere Hill-Koeffizienten ihrer pCa-Spannungs-Beziehungen auf als langsamere (Stephenson und Williams 1981; Altringham und Johnston 1982). Die tonischen Typ-I-Fasern des Schließers der Krabbe *Eriphia spinifrons* weisen ebenfalls niedrige Hill-Koeffizienten zwischen 2 und 3 auf (Galler 1989), während die phasischen Typ-IV-Fasern desselben Muskels die größten Hill-Koeffizienten mit Werten um 4 erreichen und damit den Zuckungsfasern von Vertebraten ähneln (Rüegg 1986).

4. Mögliche Bedeutung der fasertyp-spezifischen Proteine des c2-Muskels

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals für die Muskulatur bei Spinnen ein fasertyp-spezifisches Vorkommen von Proteinen gezeigt. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Fasertypen des c2-Muskels traten bei den Troponin-T-Isoformen mit einer molekularen Masse von 50 kDa (T_2) und 46 kDa (T_4) auf. Sie stellen somit geeignete Marker für spezifische Fasertypen dar; T_4 für die peripheren, vermutlich schnell kontrahierenden A- und B-Fasern und T_2 für die zentralen, langsam kontrahierenden C- und D-Fasern. Es folgt eine funktionelle Interpretation der fasertyp-spezifischen Proteine bzw. Isoformen (Reihenfolge nach absteigendem Molekulargewicht):

Trägt die zusätzliche P_1 -Isoform der A- und B-Fasern zur Kraftentwicklung und Stabilisierung bei schnellen Kontraktionen bei? Paramyosin ist der Haupt-„Kandidat“ für das Kernprotein der dicken Myofilamente bei Insekten und wird als Stabilisierungsfaktor der dicken Filamente diskutiert (Beinbrech, Meller und Sasse 1985). Es ist eine Art „Gerüstmaterial“, auf welches sich äußerlich eine Schicht Myosinmoleküle ansammelt, und dadurch die Dimension der dicken Filamente bestimmt. Bei den unterschiedlichen Fasertypen könnte dies durch strukturelle und kontraktile Unterschiede der Paramyosin-Isoformen in verschiedenem Ausmaß stattfinden (Pringle 1980). So sind die dicken Filamente langsamer Fasern bis zu 4-mal länger als jene in schnellen Fasern (Jahromi und Atwood 1969; 1971).

Im Falle des $\alpha 2$ -Muskels weisen allein die histochemisch und gemäß ihrer Sarkomerlängen als schnell ausgewiesenen A- und B-Fasern die P_1 -Isoform auf. Bereits 1985 schlägt Mykles das Vorkommen der P_1 - und P_2 -Isoformen von Paramyosin als Kriterium zur Unterscheidung zwischen schnellen und langsamen Fasern vor: Schnelle Fasern der Scheren- und Abdominalmuskulatur beim Hummer besitzen als Hauptvariante P_1 , welches in den langsamen Muskeln fehlt. Für den norwegischen Hummer werden von Neil und Tobasnick (1990) diese Ergebnisse bestätigt. Mykles (1985) empfiehlt die Paramyosin-Isoformen als biochemische Marker zur Faseridentifizierung bei solchen Muskeln, die noch nicht elektrophysiologisch charakterisiert sind. Auch in den Sperrtonus- („catch“¹) muskeln von Mollusken ist Paramyosin mit einem sehr hohen Anteil (75 % – 80 %) als „Rückgrat“ der Myosinfilamente vertreten (Rüegg 1971, Beinbrech 1985). Hiernach wird die Rolle von Paramyosin mit der Kraftentwicklung beim Sperrtonus und bei extremen reversiblen Längenänderungen der dicken Filamente diskutiert. Epstein, Aronow und Harris (1976) zeigten, dass das Molluskenparamyosin die Affinität von Mollusken- und Kaninchen-Myosin für F-Aktin erhöht. Auch bei der Beinmuskulatur von *C. salei* sind durchaus Mechanismen zur Kraftentwicklung und Stabilität bei Längenänderung der dicken Filamente denkbar. Unterschiedliche Paramyosin-Isoformen könnten sich zu dicken Myosinfilamenten unterschiedlicher Länge formieren, woraus verschiedene A-Band-Breiten resultieren. Für die Vogelspinne und den verwandten Pfeilschwanzkrebs *Limulus* konnte Paramyosin als Myosinstabilisierungsfaktor elektronenmikroskopisch untersucht und bestätigt werden (Levine et al. 1983).

¹ „catch“ bedeutet übersetzt „einschnappen“, „einklinken“. Damit ist die Aufenthaltsdauer der Myosinköpfe in den krafterzeugenden Zuständen gemeint, welche extrem verlängert ist.

Verschiedene Troponin-T-Isoformen weisen auf eine unterschiedliche Innervierung und Calciumregulation der Fasern hin: Troponin ist das regulatorische Protein der Vertebraten- und vieler Invertebratenmuskelzellen, welches zusammen mit Tropomyosin für die Aktivierung/Inaktivierung des Kontraktionsapparates verantwortlich ist. Es agiert als intrazellulärer Ca^{2+} -Rezeptor und reguliert potentielle Querbrückenbindungsstellen durch die Beeinflussung der Filamentstruktur. Verschiedene Troponin-Isoformen haben unterschiedliche Ca^{2+} -Aktivierungseigenschaften (Holmes et al. 2002). Troponin T ist eine der 3 Untereinheiten des Troponinmoleküls. „T“ steht für Tropomyosin-bindend. Im *c2*-Muskel ist die T_2 -Isoform (50 kDa) ein Unterscheidungskriterium zwischen langsamen und schnellen Fasern, indem sie vermehrt bei den C- und D-Fasern vorkommt. Die T_4 -Isoform (46 kDa) tritt dagegen nur bei den schnellen A- und B-Fasern prominent auf. Mykles und seine Mitarbeiter bringen eine Troponin-T-Isoform (55 kDa) funktionell mit Vorgängen an der Synapse und dem Bahnungsverhalten in Verbindung (Mykles et al. 2002). Die Isoform kommt beim Krebs-Scherenöffner nur bei den slow-tonic-S2-Fasern vor. Schnelle und langsame Fasern von Crustaceen unterscheiden sich hauptsächlich in den Troponin-T-Isoformen (Mykles 1985). Fowler und Neil (1992) unterscheiden aufgrund des Vorhandenseins einer Troponin- T_1 -Variante sogar innerhalb der langsamen Fasern 2 Subpopulationen. Diese 2 Populationen korrespondieren mit dem Verteilungsmuster der histochemischen Nachweisreaktion für Myosin-ATPase. Im *c2*-Muskel ist die T_2 -Isoform (50 kDa) ein Unterscheidungskriterium zwischen langsamen und schnellen Fasern, indem sie vermehrt bei den C- und D-Fasern vorkommt. Die T_4 -Isoform (46 KDa) tritt dagegen nur bei den schnellen A- und B-Fasern prominent auf. Mit dem gleichen Molekulargewicht (46,5 kDa, kalkuliert) ist bei *Drosophila melanogaster* Troponin-T in der asynchronen Flugmuskulatur beschrieben (Bullard et al. 1988). Die A- und B-Fasern unterscheiden sich ebenfalls stark in ihrer myofibrillären ATPase-Aktivität (hoch) von den C- und D-Fasern (mittel bis gering). Funktionell werden die Troponin-T-Isoformen als regulatorische Proteine angesehen, die das Antwortverhalten der Muskelfasern auf

neuronale Stimulation beeinflussen. Die unterschiedlichen Isoformen der regulatorischen Proteine schneller und langsamer Muskeln implizieren verschiedene Wege bei der Interaktion von Myosin und Aktin durch die Calciumregulation (Dhoot and Perry 1979). Tonische Fasern brauchen zusätzlich zu den langsamen Kontraktionsraten eine zeitlich dicht angeordnete Reihe von Aktionspotentialen vom Motoraxon, um eine komplette Kontraktion zu erreichen. Spezifische T-Isoformen könnten die Stimulationsschwelle des kontraktile Apparates anheben, so dass die volle Kontraktion nicht durch einen einzigen Reiz initiiert werden kann (Josephson und Stokes 1987). Untersuchungen bei der Skelettmuskulatur der Ratte bringen verschiedene Troponin-T-Isoformen mit einer Coexpression spezieller Myosin-HC-Isoformen in direktem Zusammenhang (Galler et al. 1997). Ein distinktes Coexpressionsmuster korreliert mit der Kinetik eines spannungsinduziertem verzögerten Kraftanstiegs (= Spannungsaktivierung, engl. „stretch activation“). Inwieweit dies auch für den *c2*-Muskel zutrifft, müsste mit entsprechenden Versuchen geklärt werden.

Troponin I hemmt Enzymaktivität: Troponin I ist ebenfalls eine der 3 Untereinheiten des Troponinmoleküls. „I“ steht für inhibierend, denn Troponin hemmt die ATPase-Aktivität von Aktomyosin. Es ist mit den dünnen, d. h. mit den Aktinfilamenten assoziiert. Nach je 7 Aktinmonomeren ist an jedem der beiden Aktinstränge ein Troponinmolekül an Aktin und Tropomyosin angelagert (Rüdel und Brenner 2000). Die regulatorischen Proteine der dünnen Filamente können in gewissem Ausmaß die Enzymaktivität der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase durch differenzierte Sensitivität für Ca^{2+} verändern (Mykles 1985). Verschiedene Troponin-I-Isoformen gereinigter Herz- und Skelettmuskeln aus dem Kaninchen determinieren die ATPase-Aktivität der Myofibrillen. Eine Troponin-I-Isoform in schnellen Skelettmuskeln hemmt die Mg^{2+} -aktivierte ATPase in größerem Ausmaß als eine Troponin-I-Isoform von langsamen Muskeln. Die Isoform der Herzmuskulatur zeigt dabei die geringste hemmende Aktivität (Mykles 1985). Im Falle des *c2*-Muskels treten zwei verschiedene

Troponin-I-Isoformen (28 u. 27 kDa) auf, die bei allen Fasertypen – nur nicht den B-Fasern – als Doppelbande erscheinen. Eine ähnliche Beobachtung beschreiben Regenstein und Szent-Györgyi schon sehr früh (1975) für die quergestreifte Muskulatur beim Hummer als 30 kDa-„Doppel-Komponente“ von Troponin-I. Auch in der Muskulatur der Zecke *Haemaphysalis longicornis* wird es als Doppelbande bei 27/30 kDa exprimiert (You et al. 2001). Die I₁-Isoform fehlt den B-Fasern des c2-Muskels. Hierin kann zwischen den schnellen A- und B-Fasern unterschieden werden, deren Proteinmuster ansonsten nahezu identisch sind (bis auf den Bandenbereich 35-31 kDa, s. u.). Ein Antikörper gegen Troponin-I markierte 6–7 Isoformen im Hummer und 4–5 in der Flusskrebsmuskulatur. Es kam zu bezeichnenden Variationen bei den Troponin-I-Isoformen zwischen den verschiedenen Fasertypen (Sohn, Mykles und Cooper 2000). In der Extensormuskulatur von *Idotea spec.* wurde eine Proctolin-induzierte Erhöhung der Phosphorylierung von Troponin-I (30 kDa) beobachtet. Der Beitrag zu einer möglichen Kontraktionspotenzierung wird noch untersucht (Brüstle et al. 2001). Die Aminosäuresequenz des Troponin-I aus der Schwanzmuskulatur des Flusskrebses (kalkulierte molekulare Masse von 23,5 kDa) zeigt die Protein-Protein-Interaktion mit Troponin-T und -C auf (Kobayashi et al. 1989).

Zusätzliche Troponin-C-Isoformen weisen auf eine besondere Calciumbindung hin : Troponin-C ist die letzte der 3 Untereinheiten des Troponinkomplexes. „C“ steht für Ca²⁺-bindend. In dem 17-kDa-Bereich treten bei der Coomassie-Färbung zwei Banden bei den C/D-Fasern auf, die die A-Fasern nicht exprimieren. Die von Garone et al. (1991) identifizierten und sequenzierten Troponin-C-Isoformen vom amerikanischen Hummer haben errechnete Massen von 16,996 (TC-1), 17,038 (TC-2a) und 16,951 (TC-2b) kDa, liegen also im selben Bereich wie bei *C. salei*. Sequenzanalysen legen nahe, dass diese Isoformen Produkte dreier verschiedener Gene sind und nicht verschiedene Spleißvarianten eines einzigen Gens.

Myosin (M) LC und HC bestimmen die Fasermechanik und -verkürzungsgeschwindigkeit:

Jedes Myosinmolekül (M, 500 kDa) setzt sich aus 2 schweren Ketten (HC, 200 kDa) mit je einem fadenförmigen Schwanzteil und einem globulären Kopfteil zusammen. An jedem Kopfteil sind je 2 leichte Ketten (LC, 16–27 kDa) angelagert, eine essentielle und eine regulatorische (Reggiani, Bottinelli und Stienen 2000). Schnelle und langsame Fasern bei Vertebraten besitzen bestimmte Myosin-Isoformen, die sich sowohl in ihren schweren als auch in ihren leichten Ketten unterscheiden (Termin, Staron und Pette 1989; Galler et al. 1997). Gruhn und Rathmayer (2002) erwähnen eine für Crustaceenmuskulatur erstmals beschriebene entwicklungsspezifische MHC-Isoform. Die im postembryonalen Stadium identifizierten MHCs unterscheiden sich von denen im adulten Krebs. Bezüglich einzelner MLCs existiert ein muskelspezifischer Polymorphismus; es wurden insgesamt 5 Isoformen der leichten Ketten des Myosins identifiziert (24, 23, 22, 18 und 17,5 kDa), von denen je eine für die tiefen und für die oberen Extensoren spezifisch ist. Allerdings beobachtet Gruhn (2000) für die 23-KDa-Isoform der tiefen Extensorenmuskulatur eine Neigung zur Degradation, weshalb er nicht ausschließt, dass die 22-kDa-Isoform ein Artefakt ist. Für den Hummer werden die leichten Ketten des Myosins in 3 α - (21, 22 und 23,5 kDa) und 2 β - (18, 18,5 kDa) Isoformen unterteilt (Mykles 1985). Die in der Literatur beschriebenen MLC-Isoformen nehmen insgesamt ein niedermolekulares Spektrum von 17,7 kDa (Collins et al. 1986) bis 25 kDa (Silverman, Costello und Mykles 1987) ein. Die postulierten MLC-Isoformen des c2-Muskels liegen ebenfalls in diesem Bereich (19–24 kDa).

Die LC₂-Isoform (22 kDa) ist spezifisch für die schnellen A- und B-Fasern. Die Isoformen der leichten und schweren Ketten des Myosins stehen im Zusammenhang mit den mechanischen Eigenschaften der Muskelfasern und ihren maximalen Verkürzungsgeschwindigkeiten (Gruhn und Rathmayer 2002). Da die myofibrilläre ATPase eine Enzymaktivität der Myosin-HC ist, korreliert die histochemische Färbung für die Aktivität von mATPase mit der Präsenz von Isoformen der MHC in einzelnen Muskelfasern (Gruhn und Rathmayer 2002).

Die Präsenz und Kombination verschiedener MHC-Isoformen wird partiell verantwortlich gemacht für die unterschiedliche Muskelfasertyp-spezifische mATPase-Histochemie, welche wiederum mit passiven Membraneigenschaften der Muskelfasern korreliert (Gruhn und Rathmayer 2002). Über die Verteilung der MHC-Isoformen auf die verschiedenen Fasergruppen des c2-Muskels kann ich jedoch methodisch bedingt (kein zweidimensionales System) keine Aussagen treffen. Die Myosin-HC-Isoformen haben, wie auch die Tropomyosin-Isoformen, ähnliche Massen, und können daher nicht in konventionellen eindimensionalen Gelen unterschieden werden (Mykles 1985). Da sich die Fasertypen des c2-Muskels jedoch in ihrer myofibrillären ATPase-Aktivität unterscheiden (siehe Ergebnisse II. 1.), liegt nahe, dass sie auch Fasertyp-spezifische MHC-Isoformen aufweisen.

Bandenbereich 31–35 KDa; Proteinkinasen oder weitere Troponin-I-Isoformen? Bei den Banden im 31–35-KDa-Bereich könnte es sich einerseits um Proteinkinasen handeln, die vermehrt bei den C/D-Fasern vorkommen. Bei *Mytilus edulis* werden mit ähnlichen molekularen Massen zwei verschiedene Proteinkinase-Typen beschrieben, die Proteine des kontraktile Apparates phosphorylieren (Sailer 1992). Die Ca^{2+} -CaM (Calmodulin)-Kinase konnte dem Funktionskreis der Acetylcholin-kontrollierten Kontraktion und die cAMP-Kinase dem der Serotonin-kontrollierten Erschlaffung zugerechnet werden. Die Regulation der Kontraktion des Sperrmuskels bei der Miesmuschel beruht demnach mit auf Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Muskelproteinen (z. B. Paramyosin). Nairn und Greengard (1987) bringen die Ca^{2+} -CaM-Kinase mit der Phosphorylierung der MLC-Isoformen in Verbindung, allerdings in der glatten Muskulatur vom Rind. Weitkamp, Jurk und Beinbrech (1998) diskutieren eine Proteinkinase und das ihr assoziierte Protein (30 kDa) im Zusammenhang mit Änderungen der Calciumsensitivität der Aktomyosin (myofibrillären)-ATPase im Insektenmuskel.

Andererseits könnten sich hinter den Banden im 31–35-kDa-Bereich auch weitere Troponin-I-Isoformen verbergen. Wie bereits erwähnt wurde ein 30-kDa-Protein in der Extensor-muskulatur von *Idotea spec.* als Troponin-I identifiziert (Brüstle et al. 2001).

43-KDa-Bande, eine Aktin-Isoform? Bei der in langsamen C/D-Fasern auftretenden schmalen 43-kDa-Bande könnte es sich, aufgrund der unmittelbaren Nähe zu der Aktin-Bande (44 kDa), um eine Aktin-Isoform handeln. Von *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass insgesamt 6 Aktine existieren (Fyrberg et al. 1998), die unterschiedliche Isoformen in mehreren Muskelgruppen exprimieren.

Unterschiede im Anfärbeverhalten der Polypeptide bei CCB- und Silberfärbung: Je nach verwendeter Färbetechnik (Coomassie-Brilliant-Blue oder Silbernitrat) erhielt ich im niedermolekularen Bereich ein unterschiedliches Erscheinungsbild an Proteinen. Mykles (1985) beschreibt ähnliche Beobachtungen: So färbte Coomassie-Brilliant-Blue Troponin-C prinzipiell nur schwach. Nach einer speziellen Aufreinigung (Regenstein und Szent-Györgyi 1975) zeigten sich jedoch deutlich 3 verschiedene Troponin-C-Varianten. Allerdings ließ in diesem Fall die Silberfärbung Troponin-C und Tropomyosin nur schwach hervortreten. Hierbei erhöht eine hervorgegangene Behandlung mit 10 % Glutaraldehyd die Färbung Calciumbindender Proteine, wie zum Beispiel Troponin-C (Schleicher und Watterson 1983). Dieses könnte erklären, warum bei meinen mit Silbernitrat gefärbten Gelen jeweils bei 22 kDa in den A- und B-Fasern deutlich eine Bande ausgeprägt war, die jedoch bei Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung fehlte. Da die vorliegenden Gele auch mit 10 % Glutaraldehyd behandelt wurden, bliebe abzuklären, ob es sich bei der 22-kDa-Bande tatsächlich um eine LC- oder aber um eine Troponin-C-Isoform handelt. Mykles (1985) beschreibt 3 Troponin-C-Isoformen für die Scherenschließmuskulatur beim Hummer im Molekularbereich um 21 kDa.

II. Die polyneurale Muskelinnervation gewährleistet eine fasertyp-spezifische und verhaltensadäquate Rekrutierung

Zu der peripheren funktionellen Arbeitsteilung durch die 4 Fasergruppen im *c2* gesellt sich eine zentrale Ansteuerung durch mehrere Motoneurone, die sich unterschiedlich auf einzelne Fasertypen verteilen.

1. Anzahl und Lage der Motoneurone und ihre Verteilung auf die Fasertypen: motorische Einheit

Anzahl der Motoneurone: Wie die Ergebnisse der Backfills zeigen, wird *c2* polyneural innerviert. Für *Cupiennius salei* gibt es bereits ein weiteres Beispiel einer Mehrfachinnervierung ihrer Beinmuskulatur: Maier, Root und Seyfarth (1987) konnten für den Krallenlevator eine Innervierung durch 3 Motoaxone, je ein schnell und langsam erregendes und zusätzlich noch ein inhibitorisches Axon, feststellen. Wie im Folgenden erläutert taucht die Zahl 6 für die Anzahl von innervierenden Motoneuronen bei verschiedenen motorischen Systemen von Arthropoden in der Literatur immer wieder auf. Die Beinmuskulatur der Vogelspinne *Dugesia hentzi* wird polyneural innerviert (Ruhland und Rathmayer 1978). Hier wurde eine Versorgung der Beinmuskeln durch meistens 6 „Nervenäste“ beobachtet. Die Anzahl der Motoneurone des *c2*-Muskels liegt damit durchaus im üblichen Bereich für die Extremitätenmuskulatur bei Arthropoden. Auch die Muskelfasern der abdominalen, oberen Extensoren des Flußkrebsses *Orconectes limosus* werden von insgesamt 6 Motoneuronen innerviert, wovon 5 erregend und eines hemmend auf den Muskel wirkt (Gruhn 2000).

Lage der Motoneuronen: Die Lage der *c2*-Motoneuronen, d. h. die dendritischen Aufzweigungen in den dorsalsten Schichten des Unterschlundganglienkomplexes und die Somata in der ventralen Cortexschicht, jeweils im betreffenden Neuromer, bestätigen die Teilbefunde von Milde und Seyfarth (1988) und von Kadel (1992). Sie identifizierten durch intrazelluläre

Ableitungen und iontophoretische Luzifer-Yellow-Füllungen zwei exzitatorische *c2*-Motoneurone, die im Habitus und der Lage den hier durch Backfills dargestellten Motoneuronen entsprechen. In jeweils einem Fall im Vorder- und Hinterbein wurde ein Soma im kontralateralen Beinneuromer angefärbt. Nach Massenfärbungen mit Cobalt (Babu 1985) und intrazellulären Ableitungen im ZNS (Gronenberg 1987) von *C. salei* sind solche Fälle für vermutete Motoneuronen der Beinmuskulatur auch schon beschrieben worden. Außerdem fand Kadel (1992) ein auf den *c2*-Muskel modulatorisch einwirkendes Neuron, dessen Soma ebenfalls im kontralateralen Neuromer liegt und das eine Kollaterale in den motorischen Nerv von *c2* sendet. Kontralateral gelegene Somata von Motoneuronen sind häufig Kandidaten für inhibitorische Neurone, oft für den Common Inhibitor (CI). So konnten Wiens und Wolf (1993) den CI der Muskulatur der Thoraxgliedmaßen des Flusskrebses *Orconectes* nachweisen und mit dem CI1 von *Locusta* homologisieren. Die Lage seines Somas im ZNS beschreiben sie jeweils mit „medial bis kontralateral“.

Verteilung der Motoneuronen auf die Muskelfasertypen, motorische Einheit: Die Innervation der Arthropodenmuskulatur erfolgt über funktionell verschieden erregende Motoneuronen (Rathmayer und Maier 1987; Rathmayer 2000). Entweder führt eine niederfrequente Aktivität zu langsamen Kontraktionen oder aber ein einziger Impuls erzeugt eine schnelle Zuckung des Muskels. Man nennt diese Neurone in Hinblick auf ihre Wirkung langsame oder schnelle Motoneurone. Von Insekten und Crustaceen ist bekannt, dass sie bei der Lokomotion vorwiegend auf die Innervation durch langsam erregende Motoneurone zurückgreifen. Die Zuschaltung schneller Motoneurone erfolgt nur gelegentlich zu Beginn einer Muskelaktivierung und scheint als Reserve für schnelle Bewegungsabläufe (Beutefang, Flucht) zu dienen (Rathmayer 2000). Besonders die tonischen Fasern werden von Common-Inhibitor-Neuronen gehemmt, damit sie sich nicht an den Kontraktionen beteiligen. Eine Koaktivierung beider Fasertypen (tonisch und phasisch) würde den reibungslosen schnellen Verlauf von

Kontraktionen während des Laufens stören. Bei laufenden Heuschrecken führt zum Beispiel eine Inaktivierung des CI-Neurons zu einer Verlangsamung der Schwingphasen, da sich durch den Wegfall der Hemmung wieder vermehrt tonische Fasern an den Kontraktionen beteiligen und deren Erschlaffung herauszögern (Wolf 1990). Für den *c2*-Muskel von *C. saleyi* nehme ich eine ähnliche Inhibierung der vermutlich tonischen Fasern vom C- und D-Typ während schneller Bewegungsphasen an. Zwei der Axonquerschnitte im *c2*-Nerv waren GABA-immunpositiv und lassen somit auf die Existenz inhibitorischer Neurone schließen. Der geringe Durchmesser des einen Axonprofils deutet funktionell auf einen sogenannten Common-Inhibitor hin. Für den Krallenhebermuskel von *C. saleyi* ist eine inhibitorische Innervation der langsamen D-Fasern bereits nachgewiesen (Maier, Root und Seyfarth 1987).

Der Krallenheber von *C. saleyi* wird durch 2 exzitatorische Axone (einem FLE = fast levator excitator und einem SLE = slow levator excitator) und ein inhibitorisches Axon innerviert, die sich unterschiedlich auf die vier Fasertypen verteilen (Maier, Root und Seyfarth 1987). FLE innerviert A-, B- und C-Fasern, SLE versorgt B-, C, und D-Fasern und ein Inhibitor hemmt die D-Fasern. B- und C-Fasern werden somit doppelt, A- und D-Fasern einfach innerviert.

Für *c2* steht diese Innervationsbeziehung noch aus. Hinter den 6 Motoneuronen des *c2* können sich mehrere langsam und schnell erregende (insgesamt 4) und 2 hemmende Neurone verbergen, die sich unterschiedlich auf das Faserspektrum, ähnlich wie bei dem Krallenheber verteilen. Denkbar ist, dass die A-Fasern nur einfach exzitatorisch durch ein schnelles Motoneuron innerviert werden, dadurch in der Modulierbarkeit der Kontraktion eingeschränkt und nur an einfachen stereotypen Bewegungen mit schnellen und wegen ihres großen Querschnitts auch kraftvollen Kontraktionen beteiligt sind. Der apodemale Anteil wird wahrscheinlich durch ein separates schnelles Motoneuron innerviert, da er gezielt dazu „geschaltet“ werden kann (siehe Ergebnisse IV. Aktivität des *c2*-Muskels). Für die B- und C-Fasern ist eine Doppelinnervierung durch ein schnelles und ein langsames Motoneuron wie

im Krallenheber ebenfalls gut vorstellbar, eventuell sogar für die C-Fasern noch eine zusätzlich inhibierende wie im Falle der Krabbenmuskulatur (Rathmayer und Maier 1987). Die D-Fasern scheinen auch im *c2*-Muskel eine kleine aber spezialisierte Fasergruppe zu sein, die eine ähnliche Innervierung wie beim Krallenheber vermuten lässt, also doppelt durch ein langsames Motoneuron und einem Inhibitor. Allgemein wird die heterogene Zusammensetzung motorischer Einheiten aus verschiedenen Muskelfasertypen als funktionelle Kompensation für die spärliche Innervation durch wenige Motoneurone angesehen (Rathmayer 2000).

Diskrepanz von Anzahl Motoneuronen und Axonquerschnitten im Nerv: Hinweis auf periphere Inhibition? Die Anzahl der Axonquerschnitte (bis zu 20 und mehr) im Nerv widersprach der Anzahl der vermeindlich vorhandenen Motoneurone (6). Wie kann es zu einer solchen Diskrepanz kommen? Die 6–7 großen Profile könnten zu den Motoneuronen gehören. Was aber verbirgt sich hinter den kleineren Profilen? Neuerdings konnte eine periphere, schnelle und selektive Inhibition von mechanosensorischen Afferenzen durch efferente Synapsen bei *C. salei* nachgewiesen werden (Panek et al. 2002; Fabian-Fine 1999; Fabian-Fine, Meinertzhagen und Seyfarth 2000). Demnach erhält das Spaltsinnesorgan VS-3 ein ausgeprägtes Netzwerk GABA-immunreaktiver efferenter Synapsen auf seinen sensorischen Dendriten, Somata und distalen Axonen. Mehrere feine efferente Fasern verlaufen parallel zu den sensorischen Neuronen. Über die funktionelle Bedeutung wird Folgendes spekuliert: Möglicherweise stellt diese periphere Inhibition einen Unterscheidungsmechanismus für Reize bei der Partner- oder Beutelokalisation dar und befähigt die Spinne, jeweils adäquat zu reagieren. Allerdings ist über die zentrale Herkunft dieser Efferenzen nichts Genaues bekannt. Somit sind die überzähligen, kleinen Axonprofile im *c2*-Nerv vermutlich solche efferente Fasern, die periphere Sinnesorgane, z. B. im Coxabereich, versorgen. Im Anhang II der vorliegenden Arbeit stelle ich den internen Gelenkrezeptor R_0 vor, der im Prosoma-Coxa-Gelenk eines jeden Beines liegt und eng mit dem Körperanhebeverhalten von *C. salei* assoziiert ist.

Funktion inhibitorischer Innervation: Wie die Befunde der GABA-Immunocytochemie an Semidünnschnitten des *c2*-Nerven nahe des Muskels der Vorder- und Hinterbeine zeigen, befinden sich darin jeweils 2 immun-positive Axonprofile. Das GABA-ähnlich immunreaktive Axonprofil mit dem geringeren Durchmesser im *c2*-Nerv könnte ein möglicher CI-Kandidat sein. Es ist bekannt, dass die Axondurchmesser der CIs stets deutlich geringer als die aller anderen Motoneurone sind (Homberg, Bleick und Rathmayer 1993). Synchrone Biotin- und NiCl_2 -Anfärbungen mehrerer Beinmuskeln von *C. salei* zum Nachweis eines potentiellen CI schlugen bisher allerdings fehl (Ernst-August Seyfarth persönliche Mitteilung). Der mögliche CI des *c2*-Muskels könnte funktionell die tonischen C- und D-Fasern ausschalten, insbesondere bei schnellen Bewegungsabläufen, in denen der *c2*-Muskel aktiviert wird (ruckartiges Körperanheben, Flucht, Sprung, schnelle Laufstarts, Aufwärtsschlag beim Autotomieren). Sowohl bei Schaben als auch bei Stabheuschrecken (Tryba und Ritzman 2000) wird die elektrische Aktivität der exzitatorischen Motoneurone der Extensoren-muskulatur beim Lauf nachweislich periodisch durch Inhibition unterbrochen.

Die inhibitorische Wirkung von GABA speziell bei Arachniden wurde schon mehrfach bestätigt: bei der Aktivität des Spinnenherzens (Sherman 1985) und bei der Laufbein-muskulatur (*promotor tibiae* und beim Krallendepressor) der Vogelspinne (Brenner 1972; Ruhland und Rathmayer 1978). Für *C. salei* selbst gibt es ebenfalls positive Befunde für das Vorkommen und die Verwendung von GABA im ZNS (Duncker 1992) und in der Peripherie (Fabian-Fine 1999; Fabian-Fine, Meinertzhagen und Seyfarth 2000). Duncker (1992) fand 2 Gruppen GABA-immunreaktiver Zellen im Unterschlundganglion (USG) von *C. salei*. Bei einem Vergleich dieser Areale GABA-ähnlicher Immunreaktivität mit den Arealen in denen die Somata der *c2*-Motoneurone liegen, fällt auf, dass genau das jeweils im Neuomer anterior zur Nervanfüllung gelegene Soma im Bereich der GABA-Immunreaktivität liegt. Dieses Soma könnte demnach zu einem möglichen Motoneuron vom Typ eines spezifischen Inhibitors gehören.

2. Wie verhält sich die Anzahl neuromuskulärer Einheiten zu der der Motoneuronen?

Hinter der Anzahl der verschiedenen neuromuskulären Einheiten innerhalb des Elektromyogramms von *c2* „verbirgt“ sich die für diese spezifische Antwort verantwortliche Innervation (Motoneuronen) und Heterogenität des Muskels (Fasertypen). Im Falle des *c2*-Muskels scheint es so zu sein, dass nicht alle 6 der durch die Backfills markierten Motoneuronen bei dem Körperanheben zum Einsatz kommen. Vielmehr werden nur 3 neuromuskuläre Einheiten regelmäßig rekrutiert (**Abb.14 a, b** und **15 b, c**; Einheit „1“, „2“, „3“). Offenbar kommen die verbleibenden Motoneuronen bei anderen Verhaltensweisen zum Einsatz – zum Beispiel, wenn die Spinne bei einem plötzlichen Windreiz (durch Anpusten) flüchtet (**Abb. 14c** und **Abb. 16c**). In dieser Versuchssituation kommen schnelle neuromuskuläre Einheiten mit großer Amplitude im Elektromyogramm hinzu, die zuvor bei der lokalen und plurisegmentalen Reaktion des Körperanhebens nicht auftraten. Diese schnellen Einheiten bei Schreckreaktionen finden sich sowohl in Ableitungen des tergalen als auch des apodemalen *c2*-Anteil. Ich vermute bei der Aktivierung (Innervation durch schnelles Motoneuron) dieser schnellen Einheiten („F“ für engl. fast) Kontraktionen von Muskelfasern des A- und B-Typs, die mit ihren histochemischen Eigenschaften (hohe ATPase-Aktivität) die nötige Voraussetzung für derartige Bewegungen besitzen. Dagegen rühren die weiteren neuromuskulären Einheiten höchstwahrscheinlich von tonischen Kontraktionen der C- und D-Fasern her, die mit ihrem erhöhten SDH- und Glykogengehalt für langsamere und andauernde Kontraktionen geeignet sind. Wenn man die im Ergebnisteil charakterisierten Einheiten addiert und mit der vermutlich 2-fachen inhibitorischen Innervierung zusammenzählt, ergibt sich die Zahl 5. Dann kämen noch 1–2 schnelle Einheiten, die bei Schreck- und Fluchtsituationen zusätzlich zu den anderen rekrutiert werden, dazu; so ergeben sich insgesamt 6–7 neuromuskuläre Einheiten, was ungefähr mit der Anzahl markierter Motoneuronen bei den Backfills übereinstimmt.

III. Vorderbeine versus Hinterbeine: mögliche Auswirkungen der *c2*-Zweiteilung

Was den tergalen Anteil angeht, sind Vorder- und Hinterbeine vom histochemischen Heterogenitätsgrad und der Faserverteilung mit Sarkomerlängen und Proteinen identisch. Der identische Fasertyp liefert sozusagen die gleiche molekulare Basis in den Vorder- und Hinterbeinen. Auch die Innervation des Muskels in den Vorderbeinen gleicht der der Hinterbeine. Obwohl die Vorderbeine und Hinterbeine von *C. salei* unterschiedliche Gebrauchsmuster haben (z. B. vielfältige Such- und Tastbewegungen der Vorderbeine bei Orientierung, Erkundung und Nahrungsaufnahme versus stereotypes Wegstemmen der Hinterbeine zur Kraftgenerierung im Dienst der reinen Fortbewegung) liefern identische Fasertypen denselben funktionellen Beitrag. Lagespezifische Unterschiede zeigen sich allein in der „makroskopischen Anordnung“ des *c2*-Muskels, nämlich in seiner Zweiteilung in den Vorderbeinen versus seiner Kompaktheit im Hinterbein. Diese Zweiteilung könnte eine Anpassung an besondere Bewegungsweisen (und -richtungen) und deren Anforderungen (z. B. Kräfteverteilung) sein. Die funktionellen Konsequenzen wären somit vor allem mechanischer Natur, wie zum Beispiel unterschiedliche Bewegungswinkel der Coxen oder differente Vektoren erzeugter Muskelkraft. Diese liefern ihrerseits ihren funktionellen Beitrag zu verschiedenen Bewegungsabfolgen beim Verhalten der Spinne.

Dabei ist zu beachten, dass die Faseranzahl beider Teile der Vorderbeine addiert nahezu die Faseranzahl des Hinterbeines ergibt. Der apodemale Anteil ist demnach kein zusätzlicher Muskelteil sondern stellt eine vom tergalen Anteil „abgezweigte“ A-Faserpopulation dar.

1. Die Anatomie von Beinmuskeln ist an die Beinbewegung und Lebensweise der jeweiligen Spinnenspecies angepasst

Unterschiede in der anatomischen Ausprägung der Muskulatur stehen in direktem Zusammenhang mit ihrem Gebrauch im Verhalten der jeweiligen Spezies und stellen eine Anpassung an deren Lebensumstände dar. Dementsprechend resultieren Unterschiede in der Ausprägung homologer Muskeln und Gelenken bei verschiedenen Spinnenspezies aus ihren unterschiedlichen Lebens- und Bewegungsweisen. Clarke (1986) stellte beispielsweise fest, dass die femurale Beinmuskulatur von Spinnen, die ihre Beute mit den Beinen fangen und festhalten, stärker entwickelt ist als bei solchen, die sie mit Netzen fangen.

Der *c2*-Muskel gehört innerhalb der extrinsischen Beinmuskeln zu den insgesamt 8 an der Coxa inserierenden sogenannten tergo-coxalen Muskeln. Palmgren (1980) beschrieb in seinen Arbeiten zur Muskelanatomie bei Spinnen, dass diese Muskeln zum einen bei unterschiedlichen Spinnenspezies verschieden ausgeprägt sind und zum andern aber auch innerhalb desselben Individuums, wie bei *C. salei*, von Bein zu Bein in Größe und „Stärke“ variieren. Palmgren nennt Spinnenarten (*Diplocephala spec.*), bei denen die tergo-coxalen Muskeln lang und dünn sind und stellt sie Arten gegenüber (*Pholcomma spec.*), bei denen sie massiv ausgebildet sind und damit an die Muskulatur der Gattung *Tegenaria* erinnern. Bei der Gattung *Crustalina* wird *c2* für jedes Individuum vom Vorder- bis zum Hinterbeinpaar „fortschreitend schwächer“. Auch bei der Gattung *Pholcomma* findet er für die Vorderbeine im Vergleich zu den Hinterbeinen „ungewöhnlich stark entwickelte tergo-coxale Muskeln“ (Palmgren 1980). Ein Vergleich mit der Lebens- oder Bewegungsweise der einzelnen Spezies bleibt jedoch aus, und von einer Auf- bzw. Zweiteilung des Muskels in den Vorderbeinen erwähnt er nichts. Für welche Bewegungsweisen der Vorderbeine bzw. Vorderbeincoxen könnte deren *c2*-Muskel-Zweiteilung in *C. salei* eine Anpassung darstellen?

2. Beeinflusst die Zweiteilung den horizontalen Coxabewegungswinkel während der Schwingphase?

Bei den *horizontalen Bewegungswinkeln der Coxen* zeigen sich Unterschiede zwischen den Beinpaaren 1–3 und dem Hinterbeinpaar bei der Laufbewegung dieser Beine am deutlichsten. Mit diesem Winkel ist die Bewegungsamplitude der Coxa während der Schwingphase, genauer vom Zeitpunkt des Abhebens des Beines (= das Ende des Tarsenkontaktes), bis zum Augenblick des Aufsetzens des Beines (= der Beginn des erneuten Tarsenkontaktes), gemeint. Wie Hochgeschwindigkeits-Videoaufnahmen von auf der Kugel laufender Spinnen aus der Vogelperspektive zeigen, erreichen die 1.–3. Vorderbeinpaare wesentlich größere Winkel als das Hinterbeinpaar, dessen Coxen kaum messbar horizontal ausgelenkt werden und in dem *c2* ungeteilt vorliegt. Die Skizzen des entsprechenden Standbildes in **Abb. 19** jeweils zu Beginn und Ende einer Schwingphase verdeutlichen diese Unterschiede: Die Coxa von R3 lenkt maximal nach vorne aus, während die von R4 ihre Lage während der Schwingphase so gut wie gar nicht ändert. Überhaupt passiert am gesamten Hinterbein kaum eine Veränderung in der Horizontalebene. Die Schwingphase als solche wird nicht in einer horizontalen Schwingung des Beines in die Laufrichtung der Spinne deutlich. Vielmehr verändern sich die Beinglieder und Gelenkwinkel in der Vertikalebene zueinander: sehr deutlich zwischen Trochanter und Femur und zwischen Femur und Patella, so dass sich Femur und Metatarsus einander annähern.

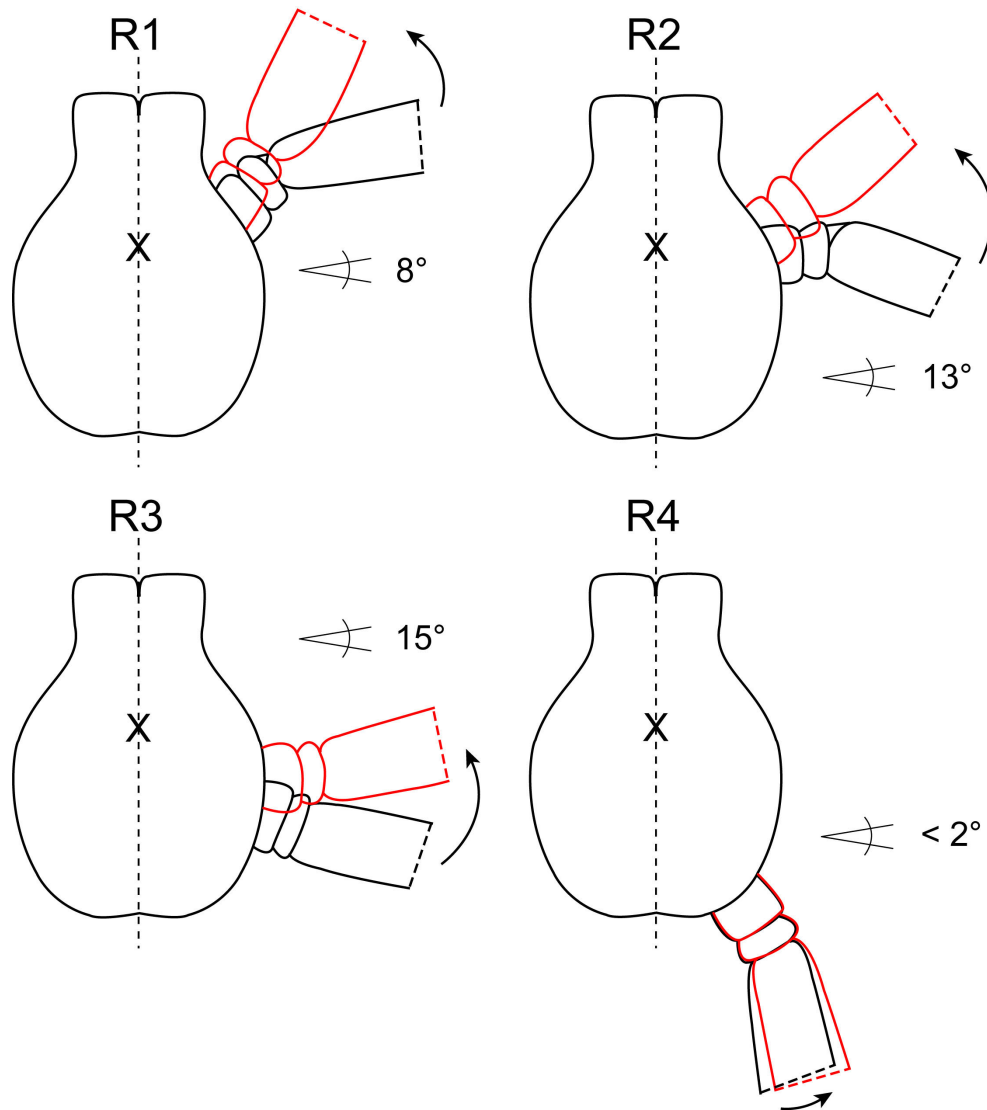


Abb. 19 Aktive horizontale Bewegungswinkel der Coxen der rechten Beine einer auf der Kugel laufenden Spinne. Dargestellt ist die Position proximaler Beinsegmente (Coxa, Trochanter, Femur) zu Beginn (schwarz) und am Ende (rot) einzelner Schwingphasen. Der Pfeil deutet die horizontale Vorwärtsbewegung des Beines bei der jeweiligen Schwingphase an. Auffällig ist die maximale Auslenkung und Bewegungsfreiheit der Coxa von **R3** (15°) und die minimale von **R4** (< 2°). Die Abbildungen entsprechen jeweils einem Bildschirm-Standbild des Videorekorders. **X**: Halterposition; gestrichelte Linie: Körperlängsachse.

3. Die Zweiteilung bewirkt eine vektorielle Kräfteaddierung beider *c2*-Anteile

Der gesamte Aktionsradius der vorderen Beinpaare ist größer als der des 4. Beinpaars. Die Vergrößerung des Aktionsradius der 1–3. Beinpaare (Schwungweite, Schwunghöhe, Coxauslenkung) geht einher mit der „räumlichen Ausdehnung“ durch die Zweiteilung (Zweiköpfigkeit) des *c2*-Muskels in diesen Beinen. Die zur Körpergröße relativ langen Spinnenbeine während der Schwingphasen in der Luft zu halten, horizontal zu bewegen, und dabei auch noch zu strecken, erfordert viel Kraft; Die durch einen Muskel produzierte Kraft ist direkt proportional mit seinem Faser-Querschnitt. Wie in **Abb. 20** schematisch dargestellt addieren sich in RL1–3 die Kräfte beider *c2*-Anteile im Kräfteparallelogramm für die horizontale Richtungs-Komponente der Coxabewegung in der Schwingphase versus einem alleinigen Kraftvektor in RL4. Im massiven, ungeteilten *c2*-Muskel der Hinterbeine wird die gesamte Kraft für die Fortbewegung in der Stemmphase während des Bodenkontakts generiert. Hier steht die vertikale Richtungskomponente („Abstoßen“) im Vordergrund. Zweiköpfigkeit bzw. mehrere Ursprünge eines Muskels stehen für eine optimale Kraft- und Spannungsaufteilung über einen bestimmten Bewegungsbereich [Hoyle 1975; Bowdan 1976 (für den Wasserläufer) und <http://www.as.wvu.edu/~sraylman/comparative/lectures/muscles/tsld009.htm>]. Der hohe Paramyosingehalt und die hohe ATPase-Aktivität der A-Fasern (apodemaler *c2*-Anteil) sprechen ebenfalls für kraftvolle Kontraktionen und Bewegungen. Vogel (2000) verbindet Apodeme, als elastische cuticuläre Strukturen, mit der Hebelfunktion von Muskeln, die als Bewegungsverstärker dienen. Bewegungsverstärker seien so verankert, dass die Kraft von der Drehstelle aus über eine weite Entfernung übermittelt werden kann. Dies wäre bei den vorderen Spinnenbeinen der Fall.

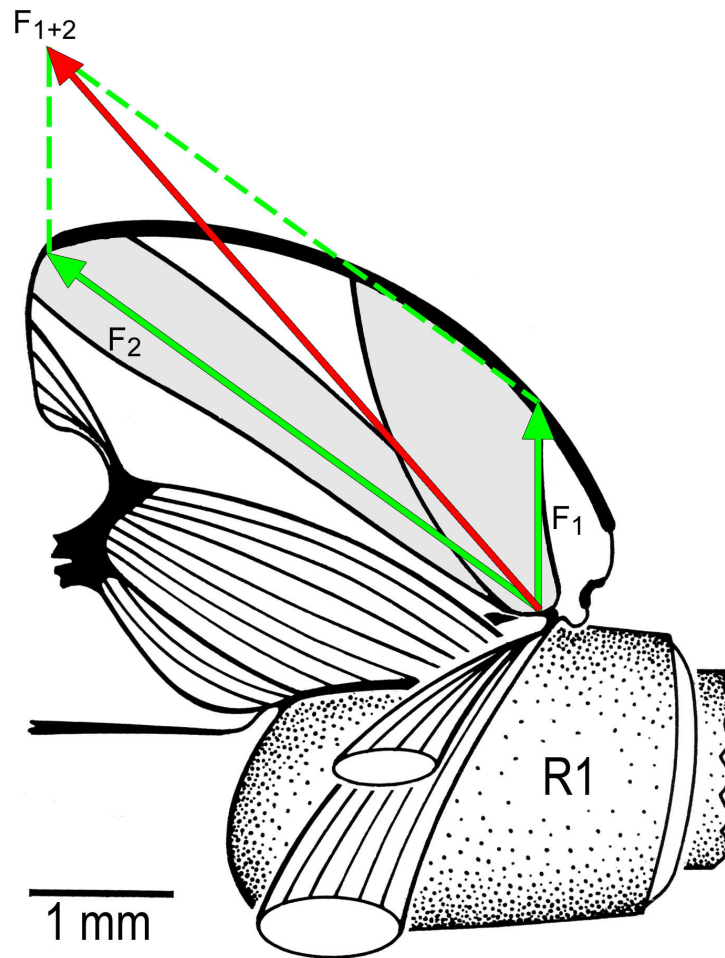


Abb. 20 $c2$ -Muskelanordnung und Kräfteverteilung im Prosoma-Coxa-Gelenk des rechten Vorderbeines (**R1**) in posteriorer Frontalansicht. Im zweigeteilten $c2$ -Muskel (hellgrau hinterlegt) teilen und addieren sich die Kräfte. Die Kraft F_1 des tergalen $c2$ -Anteils hat denselben coxalen Angriffspunkt wie die Kraft F_2 des apodemalen $c2$ -Anteils. Die Kräfte der beiden $c2$ -Anteile addieren sich vektoriell im Kräfteparallelogramm (grün) zu der resultierenden Kraft F_1+F_2 (rot). Diese Verhältnisse bestehen in allen 3 Vorderbeinpaaren, nicht jedoch im Hinterbeinpaar, in dem $c2$ ungeteilt vorliegt (**Abb. 1b**). Die Einzelkräfte F_1 und F_2 wirken sich in unterschiedliche Richtungen aus; für die resultierende Coxabewegung ergibt sich bei dem tergalen Anteil eine mehr vertikale und bei dem apodemalen Anteil zusätzlich eine mehr horizontale Bewegungskomponente.

4. Spielt die Zweiteilung bei der Autotomie eines Beines eine Rolle?

Es gibt Hinweise aus vergleichender Literatur an Crustaceen (Antonsen und Paul 2000; Moffett 1975) und Spinnen (Bauer 1972) auf eine Beteiligung von Coxalevatoren an der Autotomie des betreffenden Beines. Darunter wird die „Selbst-Amputation“ oder das „intrinsisch kontrollierte Abtrennen von Gliedmaßen an einer spezifischen Bruchstelle“ (Moffett 1996) verstanden. Dieser Reflex ist bei Arthropoden weit verbreitet und seine biologische Relevanz liegt auf der Hand; das jeweilige Tier verliert „lieber“ ein Bein als sein Leben. Für die verschiedenen Anteile („multiple heads“) der Coxalevatoren des „squat“-Hummers *Munida quadrispina* und des Flusskrebsses *Procambarus clarkii* werden verschiedene mögliche Funktionen angenommen (Antonsen und Paul 2000), unter anderem auch die des Autotomiereflexes. Die mächtigen Muskelpotentiale des apodemalen Anteils zu Beginn der Schreckphasen und Schnell-Starts bei denen *C. salei* eine neue Körperhöhe erreicht, könnte der Aktivität bei der Bewegung ähneln, die zu einer Autotomie des Beines führt. Die Bewegungen der Coxa, die zur Autotomie eines Spinnenbeines führen, werden als massiv schnell, „jäh“ (Foelix 1992) und „aufwärtsschlagend“ (Bauer 1972) beschrieben. Allerdings stellt sich dann die Frage, ob das 4. Bein etwa nicht autotomiert wird, da es hier keinen apodemalen Teil gibt. Tatsächlich gibt es Hinweise bei Krabben (Moffet 1975) und Spinnen (Bauer 1972), dass die Autotomiehäufigkeit von Bein zu Bein unterschiedlich ist und wahrscheinlich von der Länge abhängt; die relativ kurzen Hinterbeine werden seltener (16,8 %) autotomiert als die längeren des zweiten Beinpaars (29,2 %). Man könnte hieraus schlussfolgern, dass es höchstwahrscheinlich die längeren Beine sind, die ein potentieller Feind am ehesten ergreift und dass hier die Notwendigkeit des Autotomievermögens vermehrt gegeben ist.

5. Dient die Zweiteilung der Fortbewegung auf dem Wasser, dem „Rudern“?

Barnes und Barth (1991) beschreiben das „Rudern“ mit maximal gestreckten Beinen als Fortbewegung von *C. salei* auf der Wasseroberfläche von einer bestimmten Wassertiefe (ca.

10 mm) an. Hierbei setzt die Spinne interessanterweise nur die 3 vorderen Beinpaare ein, während die Hinterbeine bewegungslos dem Wasser aufliegen, statt für den Vorschub des Tieres zu sorgen, wie es sonst beim normalen Laufen auf fester Unterlage geschieht. Da es sich bei dem Rudern zum größten Teil um *horizontale* Bewegungen der vorderen Beinpaare handelt, könnten hierbei die sich in gleicher Richtung auswirkenden Kontraktionen des apodemalen *c2*-Anteils beteiligt sein. Außerdem wäre für die maximale Beinstreckung eine effektive Erhöhung des Hämolympdrucks (siehe Punkt 6.) erforderlich, an der ebenfalls Kontraktionen des apodemalen Anteils funktionell beteiligt sein könnten. Das Vorhandensein des Motorprogramms „Rudern“ ist für *Cupiennius salei* angesichts der hohen Niederschläge (bis zu 4000 mm pro Jahr, s. Barth et al. 1988) in ihrem Biotop sinnvoll und lebensnotwendig. Die Spinne *Dolomedes fimbriatus* ist dagegen optimal an ein fortwährendes Leben auf dem Wasser und das Rudern (horizontale Komponente) mit gestreckten Beinen angepasst. Tatsächlich ist hier die räumliche Ausbreitung des *c2*-Muskels in den Vorderbeinen noch weiter „fortgeschritten“ als bei *C. salei*: Der *c2*-Muskel ist zwar nicht deutlich zweigeteilt, zieht aber fächerförmig und ununterbrochen als breites Band bis zum dorsalen, tergalen Apodem (Palmgren 1980).

6. Begünstigt die Zerteilung des *c2*-Muskels die Beinstreckung durch Erhöhung des Hämolympdrucks?

Alle Beine von *C. salei* sind im Prinzip gleich gegliedert und dadurch eigentlich im gleichen Ausmaß beweglich. Die Beweglichkeit eines Beines ist außerordentlich, es gliedert sich in 7 Beinabschnitte, worin sich nicht weniger als 30 verschiedene (intrinsische) Beinmuskeln befinden (Ruhland und Rathmayer 1978). Dies ist eine im Vergleich zu Insekten (10), Crustaceen und Skorpionen (16) relativ hohe Anzahl (Seyfarth 1985). Die insgesamt sieben Beinglieder werden durch Beuge- (Flexoren) und Streckmuskeln (Extensoren) der einzelnen Gelenke bewegt. Dabei gibt es drei Besonderheiten: Dem Femur-Patella-, Tibia-Metatarsus-

und dem Metatarsus-Tarsus-Gelenk fehlen die Streckermuskeln. Hier wirkt der Hämolymphdruck als Antagonist zu den vorhandenen Beugemuskeln. Die Gelenkstreckung erfolgt ohne Muskeln vor Ort, allein durch eine Erhöhung des Hämolymphdrucks, also über einen hydraulischen Mechanismus (Parry und Brown 1959). Dabei fließt die Hämolymphe in einem System aus Lacunen zwischen den Beinmuskeln (Blickhan und Barth 1985). Es bildet einen Dorsalkanal (Versorgung benachbarter Beinglieder) und mehrere dorsoventrale Kanäle (Versorgung innerhalb eines Beinglieds), die einen raschen Hämolymphfluss während aktiver und passiver Gelenkbewegung garantieren. Die Erhöhung des Innendrucks im Prosoma wird durch Kontraktionen der Lateral Muskulatur (Musculi lateralis), die sich ringförmig im lateralen Prosomabereich jeweils vom Pleuralsklerit zum Tergum erstreckt, hervorgerufen (Wilson 1970). Manton (1958) erwähnt die Zusammenarbeit extrinsischer und proximal intrinsischer Beinmuskeln als verwirklichtes Prinzip bei der Extension von Spinnenbeinen. Der *c2*-Muskel wird als ein extrinsischer Beinmuskel auch von Palmgren (1980) als Mitgenerator eines erhöhten Hämolymphdrucks angesprochen. Bei der Betrachtung der Frontal-Ansicht des Prosoma-Coxa-Gelenks in **Abb. 1** wird deutlich, dass sich Kontraktionen des *c2*-Muskels in einer Volumenverringerung des prosomalen Binnenraums auswirken, die wiederum eine Druckerhöhung in den Beinen nach sich zieht, die dadurch gestreckt werden. *c2* besäße demnach neben der Funktion als Coxalevator und -promotor auch die eines „extrinsischen Extensors“ im Sinne einer im Prosoma gelegenen Druckpumpe. Neuere Arbeiten diskutieren zusätzlich zum muskulären Anteil an der Druckerhöhung das Phänomen von cuticularer elastischer Energiespeicherung („resilience“) bzw. Energiebereitstellung durch elastischen Rückstoß („recoil“) cuticularer deformierbarer gelenküberspannender Scleriten bei der Extension von Spinnenbeinen (Sensenig und Shultz 2003) und beweglichen, praetarsalen Haftorganen (Arolium) in Ameisen und Bienen (Federle et al. 2001). Ob dieses Prinzip auch bei *C. salei* vertreten ist und an den hydraulisch gestreckten „Kniegelenken“ (Seyfarth 1985) pro Bein derartige cuticulare elastische Sclerite vorkommen, ließe sich nachprüfen. Die

hydraulisch vermittelte Extension der Beine beim Laufen, beim Körperanheben, bei schnellen Laufstarts und auch beim Rudern („maximal gestreckt“, Barnes und Barth 1991) könnte jedenfalls durch die *c2*-Kontraktionen hervorgerufen werden.

Zur Zweiteilung von *c2* im Zusammenhang mit dem hydraulischen Mechanismus glaube ich, dass sich besonders die schnellen Kontraktionen der A-Fasern des apodemalen Anteils effektiv bei der Druckerhöhung auswirken; haben sie doch durch ihre Anordnung mit dorsalem, apodemalen Ursprung einen längeren Kraftarm (Hebel) als die Fasern des tergalen *c2*-Anteils. Breuer (1978) bemerkt zum Hebel: „Der Hebel ist ein einfaches mechanisches Hilfsmittel, um ein Maximum an Arbeit bei minimalem Kraftaufwand zu leisten. Er erspart nicht Arbeit, sondern Kraft. Die Natur arbeitet mit möglichst langen Hebelarmen, d. h. mit möglichst großer Verschiebung, denn die den Lebewesen zur Verfügung stehende Kraft wird durch den Muskelquerschnitt (rund 40 N/mm²) begrenzt“. Der apodemale Anteil stellt eine solche „Verschiebung“ zur Mitte des Prosomas dar. So wäre die „maximale Extension“ (Barnes 1991) der Beinpaare 1–3 beim Rudern oder aber das abrupte Erreichen einer neuen Körperhöhe bei den beobachteten Schnellstarts und Schreckreaktionen möglich.

Wie lässt sich dann aber die Tatsache erklären, dass der apodemale Anteil bei diesen Verhaltensreaktionen nie rhythmisch und regelmäßig, sondern je nur einmalig und zu Beginn aktiv ist? Eventuell reicht eine Restspannung („resting tension“) der Muskelfasern aus, so wie es auch für die Beinmuskulatur der Schabe beschrieben ist (Fourtner 1981). Dafür würde der hohe Paramyosingehalt der A-Fasern sprechen, welches ein für das „catch-Phänomen“ (Sperrtonus) verantwortlich gemachtes Protein darstellt. Vielleicht ist der apodemale Anteil aber auch nur für eine schnelle und effektive Druckerhöhung zu Beginn nötig, danach sind regelmäßige Kontraktionen des tergalen Anteils ausreichend.

Der Vorteil einer Beinextension durch eine Hämolymphdruckerhöhung über *extrinsische* Muskeln kann im hinzugewonnenen Platz im Bein für weitere Flexormuskulatur gesehen werden (Chapman 1975). Hieraus ergibt sich eine Kraftzunahme im Bein, die der Spinne

einen bedeutenden Vorteil beim Fang und der Überwältigung von Beute bietet. Federle et al. (2001) postulieren auch die Schnelligkeit eines hydraulischen Systems, von dem sie annehmen, dass es weniger Zeit als ein Reflex benötigt.

7. Unterstützt die Zweiteilung die Rotation der Coxa?

Schon Manton (1958) stellte fest, dass der Mechanismus der Beinextension bei Spinnen von einer rotierenden Beinbewegung unterstützt wird. Auch Foelix (1992) beschreibt für das in Ruhestellung seitlich gerichtete 3. Beinpaar allgemein eine starke Drehung im Rumpfgelenk als Vorschub bei der Laufbewegung. Dies ist insofern interessant, als dass es an der Coxa der 1.–3. Beinpaare einen sogenannten posterioren Rotator *c4* (*Musculus tergo-coxalis posterior profundi*) gibt, dessen Kontraktion zu einer 5°-Rotation der Coxa führt (Palmgren 1978). Dieser *c4*-Muskel fehlt interessanterweise in R4 (Eckweiler 1987). Die Zweiköpfigkeit des *c2*-Muskels und das zusätzliche Vorhandensein des posterioren Rotators in den Beinpaaren 1–3 könnte diesen Beinen – vermittelt über die Coxa – einen erweiterten Bewegungsraum bei der Extension ermöglichen als dies beim Hinterbeinpaar der Fall ist. *c2* würde hierbei sozusagen als „anteriorer Rotator“ die Arbeit des posterioren Rotators unterstützen, nämlich eine nach hinten gerichtete Kreisbewegung der Coxa um die eigene Achse. Die hervorgerufene leicht gedrehte Coxastellung könnte als neue Ausgangsstellung die sich anschließende Schwingphase des gesamten Beines beim Laufen begünstigen.

8. Fazit

Die *c2*-Zweiteilung könnte zum Einen einen Einfluss auf die Bewegungsrichtung der Coxa und zum Anderen auf die Kraftvektoren des Muskels selbst haben. **Tabelle 9** fasst die gewonnenen Ergebnisse unter den Aspekten der Bein- und *c2*-Beteiligung und der Bewegungskomponenten zusammen und nimmt dabei auch Ergebnisse aus der Literatur mit auf (bis auf die Autotomieversuche wurde alles an *C. salei* untersucht).

Beim Vergleich der einzelnen Verhaltensweisen wird nochmal besonders deutlich, dass der apodemale Anteil stets nur kurz zu Beginn, schnell und nie regelmäßig und/oder rhythmisch aktiv ist. Dieselbe Verhaltensreaktion langsam ausgeführt bedarf keiner Aktivität des apodemalen Teils. Normales rhythmisches Laufen und damit auch jede Schwingphase der Coxa (horizontaler Bewegungswinkel) findet ohne Aktivität, d. h. Kontraktionen des apodemalen Teils statt. Die erzielte Wirkung seiner Aktivität muss eine anfänglich und einmalig erreichte sein. Die beteiligten Bewegungsrichtungen sind dabei sowohl vertikal als auch horizontal. So ist es vorstellbar, dass seine Kontraktionen einerseits eine mögliche Rolle bei der Prosoma-Coxa-Gelenk-Positionierung im Sinne einer Art „Vorjustierung“ oder „Arretierung“ (Seyfarth, persönliche Mitteilung) spielen könnten. Die erreichte Gelenkstellung und damit auch eine bestimmte Spannung und Stabilität könnte eine günstige Verteilung von Kraftvektoren und eine bevorzugte Bewegungsrichtung bei den nachfolgenden Kontraktionen zur Folge haben (siehe auch Erläuterung Punkt 7 zur Rotation). Andererseits, und dies halte ich für am wahrscheinlichsten, könnte durch zusätzliche, schnelle und effektive Kontraktionen zu Beginn der Verhaltensreaktion ein vermehrter Hämolympdruck im Prosoma aufgebaut und zur Extension der betreffenden Beine in dieselbigen fortgeleitet werden. Bei der Verhaltensreaktion „Flucht“ wäre das besonders nötig; muss doch hier blitzartig ein Fortkommen der Spinne mit möglichst großem Aktionsradius und Extension der Beine gewährleistet sein. Wie im Elektromyogramm der Schreckreaktion in **Abb. 16c** dargestellt, war hier auch die stärkste und längste (300 ms) Aktivität des apodemalen *c2*-Anteils zu verzeichnen. Welche Fasergruppen in der jeweiligen Beinbewegung rekrutiert werden, hängt sicherlich unter anderem von deren Geschwindigkeit ab. So werden bei sehr schnellen Bewegungen und Fluchtläufen bestimmt vorwiegend A- und B-Fasern rekrutiert, während bei langsamen Schleich- und Erkundungsgängen und bei der Balz, bei denen die Vorderbeine längere Zeit antennenartig ausgestreckt sind (Melchers 1963), auch tonische C- und D-Fasern aktiviert werden.

Tabelle 9 Sowohl beide *c2*-Anteile der 1.–3. Beinpaare, als auch der *c2*-Muskel der Hinterbeine beteiligen sich funktionell unterschiedlich an spezifischen Verhaltensweisen von *Cupiennius salei*. Zusammenfassung der Ergebnisse aus eigenen Beobachtungen und Literaturangaben mit jeweils vermuteter *c2*-Funktion und Fasertypbeteiligung. – = keine Beteiligung, + = Beteiligung, ++ = stärkere Beteiligung, ? = nicht untersucht

Verhalten bzw. Bein- bewegung	beteiligtes Beinpaar				<i>c2</i> -Aktivität		bevorzogter Richtungsanteil der Coxa-Bewegung		vermutlich beteiligter Fasertyp				vermutete <i>c2</i> -Funktion
	1.	2.	3.	4.	apo	terg	vertikal	horizontal	A	B	C	D	
lokale Reaktion Abb. 16a	+	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	+	Levator, Druckpumpe
plurisegmentale Reaktion Abb. 16b	+	+	+	+	+ nur zu Beginn	+ anhaltend	+	–	+	+	+	+	Levator, verstärkte Druckpumpe
Schreck/ Flucht Abb. 16c	+	+	+	+	++ nur zu Beginn	++ anhaltend	+	+	+	+	–	–	Rotator, Levator, Promotor, verstärkte Druckpumpe
Körperanheben: langsam Abb. 17 rechts	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	Levator, Druckpumpe
Körperanheben: schnell Abb. 17 links	+	+	+	+	+ nur zu Beginn	+ anhaltend	+	–	+	+	+	+	Levator plus verstärkte Druckpumpe
Laufstart: langsam Abb. 18a	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+	Levator, Promotor
Laufstart: schnell Abb. 18b	+	+	+	+	+ nur zu Beginn	+ anhaltend	+	+	+	+	–	–	Levator plus verstärkte Druckpumpe
rhythmisches Laufen Abb. 18a, b	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	Rotator, Levator, Promotor, Druckpumpe
Coxa-bewegungswinkel, horizontal Abb. 19	+	+	++	–	– = rhythm. Laufen	+ Eckweiler 1987	–	+	+	+	–	–	Promotor
Suchen/ Orientieren/ Balz Melchers 1963	+	+	–	–	?	?	+	+	–	–	+	+	Levator, Druckpumpe
Rotation der Coxa, Abb. 20 Palmgren 1978 Eckweiler 1987	+	+	+	–	?	?	–	–	+	+	–	–	anteriörer Rotator
Rudern auf dem Wasser Barnes und Barth 1991	+	+	+	–	?	?	–	+	+	+	–	–	Levator, Promotor, verstärkte Druckpumpe
Coxa-Aufwärtsschlag bei Autotomie, Bauer 1972 Foelix 1992	+	++	+	+	?	?	++	–	+	+	–	–	Levator, verstärkte Druckpumpe

abhängig von Beinlänge, Bauer 1972, verschiedene Species, nicht *C. salei*

IV. Offene Fragen und Ausblick

1. Weitere Aufklärung des Innervationsmusters von *c2*

Die klärende Neuron-Muskelfasertyp-Beziehung (Innervationsmuster), wie im Falle des Krallenhebers von *C. salei* (Maier, Root und Seyfarth 1987) wäre wünschenswert. Elektrophysiologische Untersuchungen mit Nerv-Muskelableitungen würden Hinweise auf eine exzitatorische und inhibitorische Innervation von *c2* erbringen: Gleichzeitige intrazelluläre Ableitungen von Endplattenpotentialen verschiedener Muskelfasertypen (A, B, C, D) des *c2*-Muskels bei Reizung verschiedener Axone des Nerven ließen Rückschlüsse auf das Ausmaß und das Vorhandensein von erregenden und hemmenden Einflüssen zu.

In den letzten Jahren haben sich neue Methoden für die Darstellung zentraler neuronaler Projektionen etabliert. Hierbei finden vor allem Dextrankonjugate mit Fluorochromen (Rhodamin) oder Biotin, kombiniert mit Lucifer-Yellow-Injektionen erfolgreiche Anwendung (Daberkow und Vaughan 1996, Reischig und Stengl 2002). Ein Versuch mit diesen Methoden zur Verifizierung der beschriebenen Ergebnisse (Anzahl Motoneuronen) wäre lohnenswert. Dabei könnten getrennte Backfills für den apodemalen und tergalen „Kopf“ von *c2* Aufschluss geben über die Anzahl der Motoneuronen, die speziell den apodemalen Anteil innervieren.

2. Kraft- und Hämolympdruckmessungen in den verschiedenen Beinen

Welche Beinbewegung erfordert wieviel Kraft: die Beine nach vorne zu schwingen und den Spinnenkörper anschließend in der Stemmphase nach vorne zu ziehen (Beinpaare 1–3) und ihn in der Stemmphase nach vorne zu stoßen (Hinterbeinpaar)? Druckmessungen während induzierter Muskelaktivität könnten Hinweise auf den Anteil des *c2*-Muskels und der Lateralmuskulatur an der Generierung bzw. Erhöhung des Hämolympdrucks bei verschiedenen Verhaltensweisen liefern (Methode Blickhan und Barth 1985).

3. Weitere Aufklärung der Funktion des apodemalen Anteils, bzw. der *c2*-Zweiteilung

Durch Denervieren oder Verletzen ließe sich der apodemale Anteil eventuell spezifisch ausschalten. Anschließend könnte untersucht werden, wie sich dieser Ausfall auf das Körperanheben, Laufen und Rudern und den Autotomiereflex von *C. salei* auswirkt. Sind der horizontale Bewegungswinkel und die Rotation der Coxa vom Wegfall des apodemalen Anteils betroffen? Des Weiteren gäben Myogramableitungen im apodemalen Anteil (Fasertyp A) während induzierter Autotomie des entsprechenden Beines Hinweise auf seine Beteiligung an diesem Reflex. Durch gezielte Ableitungen im *c2*-Nerven während induzierter Autotomie könnte die Aktivität phasischer und tonischer Einheiten untersucht werden. Wenn der apodemale *c2*-Anteil mit dem Autotomieverhalten des Beines nachweislich assoziiert ist, wäre es interessant zu erfahren, ob das 4. Bein ein anderes „Autotomieverhalten“ zeigt als die Vorderbeine, da hier der *c2*-Muskel keinen apodemalen Teil hat. Getrennte elektrische Reizung des apodemalen und tergalen Anteils ließen Aussagen über die definitive und tatsächliche durch ihre Kontraktionen hervorgerufene Bewegungsrichtung der Coxa zu.

Anhang

AI. Arbeitsanleitungen und Rezepte

1. Lösungen und Vorgehensweise bei den histochemischen Nachweisen

Beschichtung der Deckgläschen

- 1 g Gelatine in 200 ml Aqua dest. bei 60°C unter Rühren lösen
- 0,1 g Kalium-Chrom-(III)-Sulfit (Chromalaun) zugeben
- filtrieren
- mit Alkohol gereinigte Deckgläschen eintauchen, eine Nacht bei 60°C staubfrei trocknen

Nachweis von SDH-Aktivität

1.) Reaktionslösung

- 1,5 mM/l Nitroblau-Tetrazolium (NBT) = 0,08 g
 - 50 mM/l Natrium-Succinat = 0,81 g
 - 0,5 mM/l Phenazinmethosulfat (PMS) = 0,015 g
 - 1 mM/l Kaliumcyanid (KCN) = 6,5 mg
 - 5 mM/l Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) = 0,15 g
- alles gepuffert in 100 mM/l Phosphatpuffer nach Soerensen, pH 7,6

- 0,02 g NBT werden mit Puffer auf 25 ml aufgefüllt, erwärmt, abgekühlt und filtriert, pH kontrollieren
- 0,08 g Na-Succinat + 0,0015 g PMS + 0,65 mg KCN + 0,015 g EDTA werden auf 10 ml mit der NBT-Lösung aufgefüllt, filtriert, Behälter wird mit Alufolie umwickelt (PMS ist lichtempfindlich) und im Wärmeschrank auf 37°C temperiert. 20 µl dieses Färbearsatzes werden auf die frischen, 10 min getrockneten Gefrierschnitte pipettiert.

2.) Phosphatpuffer nach Soerensen 0,1 M

- ansetzen von Lösung A: KH_2PO_4 2,7 g/100 ml Aqua dest. (0,2 M)
- ansetzen von Lösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,56 g/100 ml Aqua dest. (0,2 M)
- 13 ml Lösung A + 87 ml Lösung B, auffüllen auf 200 ml mit Aqua dest. pH 7,6 (0,1 M)

3.) Fixierlösung, 10 % phosphatgepuffertes Formalin (Lillie 1954)

- 10 ml 37 % Formol + 0,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 90 ml Aqua dest. + 0,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Nachweis myofibrillärer ATPase-Aktivität

Färbeprozedur an frischen Gefrierschnitten

- 5 min Inkubation in 25 mM Na-Barbital + 18 mM CaCl_2 bei pH 9,4
(wahlweise in 25 mM TAPS + 18 mM CaCl_2 bei pH 8,4)
- 20 s Inkubation in gleichem Medium, nur + 50 μl /100 ml Mercaptoethanol
- 20–30 min Inkubation in 25 mM Na-Barbital (oder TAPS) + 18 mM CaCl_2 + 5 mM ATP
bei pH 9,4 (oder 8,4)
- 3 x 3 min in 1 % CaCl_2
- 2 x 3 min in 2 % CoCl_2
- 3 x 30 s waschen in Aqua bidest.
- 30 s fällen in Ammoniumsulfid
- 5 x 30 s spülen in Aqua bidest.
- entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, klären in Xylol, einbetten in Permount

Färbeprozedur mit Vorinkubation bei verschiedenen pH-Werten

- 10 min Vorinkubation der Schnitte in einer der folgenden Lösungen
 - a) Acetatpuffer; 100 mMol Na-acetat + 100 mMol KCl bei pH 4,6, einzustellen
mit konzentrierter Essigsäure
 - b) Acetatpuffer wie bei a, nur andere pH-Einstellung
 - c) Glycinpuffer; 100 mM Glycin + 100 mM NaCl + 50 mM CaCl_2 bei pH 10,4,
einzustellen mit Natronlauge
- 2 x 30 s waschen in Aqua bidest.
- 30 min in 50 mM Glycin + 50 mM NaCl + 30 mM CaCl_2 + 3 mM ATP, pH 9,4
- 2 x 30 s waschen
- 3 min in 1 % CaCl_2
- 2 x 30 s waschen
- 2 x 3 min in 2 % CoCl_2
- 2 x 30 s waschen
- 50 s in 1 % Ammoniumsulfidlösung

- 5 x 30 s waschen
- entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, klären in Xylol, einbetten in Permount

Nachweis von Glykogen

PAS (Perjodsäure)-Reaktion an Gefrierschnitten

- 5 min bei -25°C in 100% Ethanol fixiert
- 5 min bei Zimmertemperatur in 100% Ethanol
- 2 min 75% Ethanol
- 10 min 0,5% Perjodsäure, im Dunkeln
- 2 x 2 min waschen in Aqua dest.
- 30 min in Schiff'schem Reagenz
- 3 x 3 min in 0,5% Natriumdisulfit-Lösung
- 2 x 2 min waschen
- entwässern in Ethanol, klären in Xylol und einbetten in Permount

Liste wichtiger Chemikalien für die histochemischen Nachweise

- Adenosintriphosphat (ATP), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ Fluka # 02060
- Barbitat-Natrium, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$ (mit Bezugserlaubnis) Merck # 500538.0100
- Calciumchlorid-Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Merck # 2382
- Diastase, α -Amylase Fluka # 33470
- Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTH), $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ Fluka # 03610
- Gelatine Sigma # G-2500
- Glycin, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ Fluka # 50050
- Kaliumchlorid, KCl Merck # 4936
- KaliumchromIII-sulfid, Chromalaun, $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ Fluka # 60152
- Kaliumcyanid, KCN Fluka # 60178
- Kaliumpyrosulfit, $\text{K}_2\text{O}_5\text{S}_2$ Fluka # 60511
- Kanadabalsam Fischer Scientific #J/2980105
- Kobaltchlorid, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ Merck # 2533
- Mercaptoethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ Fluka # 63690
- Natriumacetat, CH_3COONa Merck # 6268
- Natriumazid, N_3Na Fluka # 71290

· Natriumchlorid, NaCl	Merck # 6404
· Natriumdisulfit, Na ₂ O ₅ S ₂	Fluka # 71930
· Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck # 6580
· Natronlauge, NaOH	Fluka # 71690
· Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), C ₄₀ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ O ₆	Fluka # 74030
· Perjodsäure, H ₅ JO ₆	Fluka # 77310
· Permout	Fischer Scientific #9650710
· Phenazinmethosulfat (PMS), C ₁₃ H ₁₁ N ₂ x CH ₃ SO ₄	Fluka # 68600
· Schiff's Reagenz	Fluka # 84655
· Silicagel blau, 3–6 mm	Fluka # 85342
· Succinat, C ₄ H ₆ O ₄	Fluka # 14079
· TAPS-Puffer	Sigma # T-5130

2. SDS-Gelelektrophorese

Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Trenngellösung wird mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten bis zu einer Höhe von 8,3 cm gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Ein kleiner Teil der Trenngellösung wird separat aufgehoben, als Kontrolle für das erfolgreiche Polymerisieren. Nach der Polymerisation wird der Isopropanol abgesaugt und der Rest mit Luft abgedampft. Anschließend erfolgt das Eingießen der Sammelgellösung und die Einführung der Gelkämme. Nach der Polymerisation kommen die Gele mit Parafilm umwickelt bis zu ihrer Verwendung in den Kühlschrank. (Alle Arbeitsschritte werden mit Handschuhen durchgeführt.)

10 % Trenngel (30 ml), Mischung aus

- 10 ml 30 % Acrylamid
- 3,9 ml 1 % Bisacrylamid
- 11,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.7
- 4,3 ml Aqua demin.

5 % Sammelgel (30 ml), Mischung aus

- 5 ml 30 % Acrylamid
- 7,8 ml 1 % Bisacrylamid
- 11,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
- 5,8 ml Aqua demin.

Die Lösungen werden gemischt und solange entgast, bis keine Luftblasen mehr aufsteigen (ca. 10 min). Danach werden die Lösungen mit jeweils 150 µl 20 % SDS, 150 µl 10 %

Ammoniumpersulfat (APS) und 30 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt, gemischt und das Gel sofort gegossen.

Elektrophoresepuffer (Laufpuffer, pH 8,6), 1 Liter enthält

- 12,1 g Tris-Base
- 7,5 g Glycin
- 1,0 g SDS

Probenherstellung und -zusammensetzung

10 ml Probenpuffer (= Samplebuffer SB) enthalten

- 3,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
- 1,0 ml Glycerin
- 1,0 ml 20 % SDS
- 50 µl Bromphenolblau (0,2 % in Ethanol)
- 154 mg Dithiothreitol (DTT)
- 4,75 ml Aqua demin.

Proben

- Probe A = 40 Fasern Typ A aus *c2* von Spinne #1, gelöst in 50 µl SB + 12,5 µl JAA
- Probe B = 5 Fasern Typ B von #1, gelöst in 25 µl SB + 6 µl JAA
- Probe C = 22 Fasern Typ C von #1, gelöst in 30 µl SB + 7,5 µl JAA
- Probe C/D = 30 Fasern Typ C und D von #1, gelöst in 30 µl + 7,5 µl JAA
- Probe A_{apo} = 44 Fasern Typ A_{apo}, gepoolt aus linkem und rechten *c2*-Vorderbeinmuskel (apodemaler Anteil) von #2, gelöst in 90 µl 1 % SDS
- Probe A_{terg} = 40 Fasern Typ A_{terg}, linker *c2*-Vorderbeinmuskel (tergaler Anteil) von #2, gelöst in 90 µl 1 % SDS
- Probe A₁ = entspricht Probe A_{terg}
- Probe A₄ = 40 Fasern Typ A, rechter *c2*- Hinterbeinmuskel von #2 gepoolt mit 14 Fasern Typ A, linker *c2*- Hinterbeinmuskel #2, gelöst in 90 µl 1 % SDS
- Probe C/D₁ = 22 Fasern Typ C/D, rechter *c2*-Vorderbeinmuskel #2 gepoolt mit 33 Fasern Typ C/D aus rechtem *c2*-Vorderbein von #3, gelöst in 30 µl 1 % SDS

Probe C/D₄ = 36 Fasern Typ C/D, rechter c2-Hinterbein #1 gepoolt mit 17 Fasern Typ C/D aus linkem c2-Hinterbein #3, gelöst in 30 µl 1 % SDS

Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (1973)

Zu der Probe (1 ml) werden 100 µl 1 % SDS - Lösung gegeben. Hinzu kommen 5 ml der 60 % TCA-Lösung. Das Gemisch wird mit dem Vortexmixer gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die zuvor in TCA-Lösung getauchten Filter (HAWP-Typ, Porengröße 0,45 µm), kommen in die Millipore-Filteranlage. Mit einer Wasserstrahlpumpe werden die Faserproben durch die Filter gesaugt und mit der TCA-Lösung gewaschen. Anschließend wird in einer Halterung in Amidoschwarz-Lösung ge- und in Entfärber entfärbt.

- 2 min Amidoschwarz
- 0,5 min Aqua demin.
- 3 x je 1 min Entfärber
- 2 min Aqua demin.

Die getrockneten Filter werden für 20 min in je 3 ml Elutionslösung eingebracht. Danach wird die Extinktion (630 nm) der Elutionslösungen bestimmt. Mit BSA-Standards wird für die Eichkurve genauso verfahren.

Lösungen

1.) Amidoschwarz-Lösung

- 0,1 % Amidoschwarz 10 B
- 45 % Methanol
- 10 % Eisessig (reine Essigsäure)
- 45 % Aqua demin.

2.) Entfärber (wird über Aktivkohle regeneriert)

- 90 % Methanol und 2 % Eisessig und 8 % H₂O

3.) Elutions-Lösung

- 25 mM NaOH
- 0.05 mM EGTA
- 50% Ethanol (96%)

Silberfärbung

- Gele in H_2O waschen
- 10 min. in 50 % MeOH und 10 % HAc
- 1 h in 50 % MeOH und 10 % HAc
- über Nacht in 10 % Isopropanol und 10 % HAc
- am nächsten Morgen das Gemisch noch 2x für je 30 min wechseln
- 30 min in 10 % Glutaraldehyd
- 4 x kurz und 4 x 15 min in H_2O waschen
- 30 min in DTE (1,25 mg auf 250 ml H_2O), danach kurz in H_2O waschen
- 3,5 min in ammoniak. Silberlösung A, dann 3–4 x kurz in H_2O waschen,
- in eine neue Schale geben und nochmals mit H_2O waschen
- H_2O abgießen und Reduzierlösung B zugeben, Schale ständig schütteln, sobald 1. Bande erscheint, Gel in eine neue Schale geben und Reduzierer zugeben

Lösungen

1.) Silberlösung A (200 ml)

- 3,78 ml 1N NaOH werden mit 38,2 ml H_2O und 2,8 ml NH_3 (25 %) vermischt
- dieses Gemisch wird tropfenweise mit AgNO_3 -Lösung (1,94 g AgNO_3 in 8 ml) versetzt und auf 200 ml aufgefüllt.

2.) Reduzierlösung B (1000 ml)

- 0,5 ml Formaldehyd (38 %)
- 50 mg Citrateacid, auf 1000 ml auffüllen.

3.) Entfärberlösung

- Lösung a: 37 g NaCl und 37 g CuSO_4 mit 850 ml $\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3$ (25 %, d. h. 25 ml/250 ml) bis das Präzipitat gelöst ist.
- Lösung b: 436 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in 1000 ml H_2O
- Lösungen a + b = 1 : 1, danach 1 : 10 verdünnen mit H_2O

Coomassie-Brilliant-Blue-R-250-Färbung

Die Gele werden für 20 min in frisch bereiteter 0,1 % Färbelösung belassen, anschließend zwei mal für je 20 min in 10 %iger Essigsäure entfärbt und über Nacht in 50 % Methanol inkubiert.

1 Liter Färbelösung enthalten

- 1,0 g CBB R 250
- 500 ml Methanol
- 75 ml Essigsäure

3. Nervenfüllungen („Backfills“)

Lösungen

1.) Ringerlösung für *Cupiennius salei*, entsprechend Maier, Root und Seyfarth (1987)

- 223,0 mM NaCl
- 6,8 mM KCl
- 8,0 mM CaCl₂
- 5,1 mM MgCl₂

Die Substanzen werden in einem Teil des Aqua bidest. gelöst und mit Tris-HCl-Puffer auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt. Danach wird auf einen Liter aufgefüllt.

2.) Färbelösung

- 5–10 % NiCl₂- oder CoCl₂- oder CoLysin-Lösung, 4 % Biocytin-Lösung

3.) Puffer-Lösung

- 0,1 M und 0,2 M Tris-HCl

4.) Fixier-Lösung

- 4 % Paraformaldehyd in Puffer, Ansatz 8 % ig mit 0,2 M Tris-HCl

5.) Fällungslösung

- 1 % Ammoniumsulfid-Lösung für CoCl₂, Dithiooxamid (Rubeanwasserstoff) –
Lösung für NiCl₂; 3 Tropfen gesättigte Lösung in absoluten Ethanol auf 3 ml Puffer

7.) Einbettmedium

- Araldit: 21,5 g Komponente A + 17,8 g B + 1 g C + 4 g D

6.) Stammlösung beim Intensivieren (für 2 ZNS)

- 100 ml Aqua dest.
- 10 g Saccharose
- 5 g Gummi arabicum

Intensivieren

Die Stammlösung ist am Vortag bei 60°C auf der Wärmeplatte anzusetzen. Der Wärmeschrank wird vorgeheizt und mit Glaswaren bestückt. Am nächsten Tag wird die Stammlösung mit 0,17 g Hydrochinon versetzt, unter Rühren mit Zitronensäure ein pH von 3,0 eingestellt und in den Wärmeschrank gebracht. Mit den ZNS wird wie folgt verfahren:

- in Puffer spülen
- 2 x in Aqua dest. spülen

Ab hier finden alle weiteren Schritte im Wärmeschrank bei 60°C im Dunkeln statt.

- 45 min Aqua dest.
- 60 min Stammlösung
- 60 min Entwickler I (9,9 ml Stammlösung + 0,1 ml 1 % AgNO_3 -Lsg.)
- 30 min Entwickler II unter ständiger Kontrolle bis das ZNS außen schwarz gefärbt ist
- in Aqua dest. Überführen und auf Zimmertemperatur im Dunkeln abkühlen
- über Nacht oder über das Wochenende in 70 % Ethanol aufbewahren

Dehydrieren und Einbetten

- 2 x 10 min dehydrieren in DMP
- 2 x 15 min Propylenoxid in 3 ml verschlossenen Schnappdeckelgläschen unter dem Abzug auf dem Rührer
- 60 min Araldit : Propylenoxid 1 : 3
- 60 min Araldit : Propylenoxid 1 : 2
- über Nacht Araldit : Propylenoxid 1 : 1
- 4 h Abdampfen des Propylenoxids bei geöffneten Gläschen
- 2 h in unverdünntem Araldit

- in Beamkapseln einbetten
- 18 h polymerisieren im Wärmeschrank bei 60°C
- Schneiden am Mikrotom

Inkubation der Biocytin-Vibratonschnitte

- „Cracken“ der Schnitte in 0,5 % Triton X-Tris-HCl-Puffer
- Waschen insgesamt 1 h in Tris-HCl-Puffer
- Inkubieren in ABC-Lösung für 24 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler
- Waschen in Tris, 3x 10 min
- Vorinkubation in 2 ml Diaminobenzidin (DAB)-Lösung, 15 min in einem Blockschälchen, Vorsicht: DAB ist karzinogen!
- Starten der DAB-Reaktion durch Zugabe von 20 µl 1 % H₂O₂-Lösung
- Stoppen der Reaktion nach ungefähr 7-10 min in Tris-HCl-Puffer
- Waschen in Tris
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger
- Eindeckeln der Schnitte mit Glycerin
- Umranden der Deckgläschen mit Lack

Lösungen

ABC-Lösung

- 5 ml Tris+ 0,2 g NaCl + 2 Tropfen A + 2 Tropfen B (ABC-Kit)

DAB-Lösung

- 10 mg DAB in 20 ml Tris-HCl im Ultraschallbad lösen, 1 ml 1 % NaCl-Lösung dazu

H₂O₂-Lösung

- 1 ml Aqua dest + 35 µl 30 % H₂O₂-Stammlösung

4. GABA-Immuncytochemie

Die Schnitte werden in Blockschälchen wie folgt inkubiert:

Blocken

- 1 h in Tris-HCl-0,5 % Triton-X-100, 10 % Normal Goat Serum (NGS), 1 % Bovine Serum Albumin (BSA), 4 % NaCl im Kühlschrank

1. Antikörper (Anti-GABA-BSA-Glutaraldehyd)

- über Nacht, 1:1000 in 5 % NGS, 1 % BSA, 0,2 % Tx, 4 % NaCl in Tris-HCl bei Raumtemperatur
- 5x waschen für je 10 min in Tris-HCl-0,1 % BSA, 4 % NaCl

2. Antikörper (Anti-Rabitt IgG)

- für 1,5-2 h 1:50 in Tris-HCl, 1 % BSA, 4 % NaCl bei Raumtemperatur
- 3x waschen für je 10 min in Tris-HCl-0,1 % BSA, 4 % NaCl

3. Antikörper (Peroxidase-Anti-Peroxidase, PAP)

- für 45 min 1:100 in Tris-HCl, 1 % NGS
- 3 x waschen für je 10 min in Tris-HCl-0,1 % BSA, 4 % NaCl

PAP-Block

- 15 min in 1 % H₂O₂ in Aqua dest.
- 3 x waschen in Tris-HCl

DAB -Präabsorption und -Reaktion

- 15 min in 0,05 % DAB in Tris
- ca. 8 min 0,05 % DAB in Tris-HCl, 0,01 % H₂O₂ in Aqua dest.

Einbettung

Die Vibratomschnitte werden noch 3-mal gewaschen und neu in Agarose eingebettet, bevor sie mit DMP entwässert und über Xylol in Permount eingeschlossen werden.

GPA-Fixativ (reicht für 2 ZNS)

- 2,5 ml 25 % Glutardialdehyd + 7,5 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure + 0,1 ml Eisessig + 0,3 g Saccharose

AII. Charakterisierung des internen Gelenkrezeptors R_0

Wie die Ergebnisse zum Körperanheben gezeigt haben, wird die plurisegmentale Muskelantwort aller 8 Beine von *Cupiennius salei* durch eine Bewegung des Prosoma-Coxa-Gelenks ausgelöst. Es lag demnach nahe anzunehmen, dass am Entstehungsprozess des Verhaltens Sinnesorgane beteiligt sind, die der Spinne Informationen über die Stellung und Bewegung dieses Gelenks übermitteln. Interne Gelenkrezeptoren sind solche Sinnesorgane. Sie perzipieren Bewegungen im Körperinneren. Bei gegliederten Extremitäten liegen sie jeweils in Gelenkhöhe. Bisher wurden für jedes Spinnenbein ab dem Coxa-Trochanter-Gelenk bis zum Metatarsus-Tarsus-Gelenk insgesamt 20 dieser internen Gelenkrezeptoren (proximal vom Körper R_1 bis distal zur Peripherie R_{20}) beschrieben (Rathmayer und Koopmann 1970; Seyfarth, Eckweiler und Hammer 1985). Es stellte sich die Frage, ob auch für das Prosoma-Coxa-Gelenk ein interner Gelenkrezeptor existiert und wenn ja, ob dieser mit der plurisegmentalen Reaktion des Körperanhebeverhaltens assoziiert ist. Da *C. salei* die Coxa der Hinterbeine beim Laufen kaum horizontal auslenkt, war es interessant zu erfahren, ob eventuell Unterschiede in der Lage und Anordnung eines vermeindlich in diesem Gelenk existierenden Gelenkrezeptors zu denen der 1.–3. Beinpaaren vorhanden sind.

Material und Methoden

R₀-Ausschaltung und Myogramme: Die Ausschaltexperimente nahm ich zusammen mit meinen Kollegen Michael Kadel an adulten *C. salei*-Weibchen vor. Hierzu wurde bei einer auf dem Halter festgelegten Spinne ein kleiner Schnitt mit einem Splitter einer Rasierklinge in die Gelenkhaut, oberhalb der Wölbung des Coxarandes des entsprechenden Beines, platziert. Anschließend wurde ein angespitztes Wolframdrahtkähchen in der Wunde vorsichtig hin und

her bewegt, so dass entweder der R₀-Nerv durchtrennt oder der nah gelegene R₀-Gelenkrezeptor zerstört war. Um herauszufinden, ob allein schon die Wunde Verhaltensänderungen nach sich zieht, wurde als Kontrolle ein ähnlicher Schnitt in die Gelenkhaut eines anderen Prosoma-Coxa-Gelenks gemacht, jedoch ohne den Gelenkrezeptor zu zerstören.

Die Implantation der Ableitelektroden und die eigentlichen Myogramexperimente wurden wie in „Material und Methoden, VIII.“ beschrieben vorgenommen. Nach den Ableitungen wurde jeweils präparatorisch kontrolliert, ob der R₀-Nerv oder das R₀-Sinnesorgan tatsächlich zerstört waren.

R₀-Anatomie: Die Präparationen zur Lage und Anordnung des Gelenkrezeptors wurden an alkoholfixierten adulten Spinnenweibchen durchgeführt (70 % Ethanol). Die anatomischen Verhältnisse skizzierte ich am Binokular mit aufgesetztem Zeichenspiegel.

Backfills: Um zu erfahren, in welche Regionen des ZNS die Sinneszellen des Gelenkrezeptors projizieren, wurden Nervanfüllungen mit verschiedenen Tracern vorgenommen. Bei der mit CO₂ betäubten Spinne wurde das Abdomen abgetrennt, das verbliebene Prosoma mit Wachs verschlossen und bäuchlings in einer Sylgardschale festgesteckt. Durch eine seitliche Öffnung im Tergum, in der Region der Lateralmuskulatur, verschaffte ich mir Zugang zu dem Gelenkrezeptor und dessen Nerv. Das sensorische Ganglion und der proximale Nerv wurden unter Ringer von der Gelenkmembran abgelöst und mit Vaseline unter- und umspritzt. Kurz vor der Nervdurchtrennung wurde Ringer gegen Aqua dest. ausgetauscht, worin der Nervstumpf noch 5–10 min zum Quellen verblieb. Danach kam die jeweilige 1 %–3 %ige Tracerflüssigkeit (NiCl₂, NiCl₂ + BSA, CoCl₂ oder CoLysin) in den Vaselinepool und das Präparat für ca. 18–24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C in den Kühlschrank.

Um nähere Informationen über Anzahl und Organisation der Sinneszellen im Ganglion zu

erhalten, füllte (NiCl₂) ich in einem Präparat den R₀-Nerv auch vom ZNS aus ganglionwärts, intensivierte das sensorische Ganglion als Wholemout-Präparat und klärte es in Methylsalicylat. Bei der histologischen Aufarbeitung der Füllungen wurde genauso verfahren, wie bei den Backfills des c2-Nerven (siehe Material und Methoden VI. und Anhang AI. 3.).

Elektronenmikroskopie: Um eine Vorstellung über die Anzahl und Anordnung vorhandener Axone im R₀-Nerven zu bekommen, wurden Präparate desselbigen mit konventionellen Methoden zur Elektronenmikroskopie aufbereitet. Um den Nerv gut justieren zu können (die Schnittebene sollte genau senkrecht zum Nerven verlaufen), fand vor der eigentlichen Einbettung in Epoxidharz (Epon 812) eine Flacheinbettung des Präparates zwischen einem Objektträger und einer Overheadfolie statt. Nach dem Aushärten konnte dieses flache Präparat optimal in einer Beamkapsel ausgerichtet werden. Anschließend wurde mit einem gut durchmischten und entgasten (Exsikkator) Epongemisch übergossen und 14 h bei 60°C polymerisiert. Die Auswertung (Zählung von Axonquerschnitten) fand an Fotos von Ultradünnschnitten des Nervenquerschnitts im Transmissions-Elektronenmikroskop statt.

Ergebnisse

1. Wird der interne Gelenkrezeptor R₀ ausgeschaltet, bleibt die plurisegmentale Reaktion aus

Bei ausgeschaltetem Gelenkrezeptor R₀, kommt keine plurisegmentale Reaktion zu Stande. Ein solches Ausschaltexperiment zeigt **Abb. 21** mit jeweils drei aufeinanderfolgenden Myogrammen von c2-Muskeln mehrerer Beine. In **Abb. 21a** ist der Gelenkrezeptor in L1 noch intakt und eine passive Auslenkung der Coxa in L1 (**dis. L1**) führt erwartungsgemäß neben der lokalen Reaktion in L1 noch zu einer plurisegmentalen Reaktion in den c2-Muskeln der Hinterbeine.

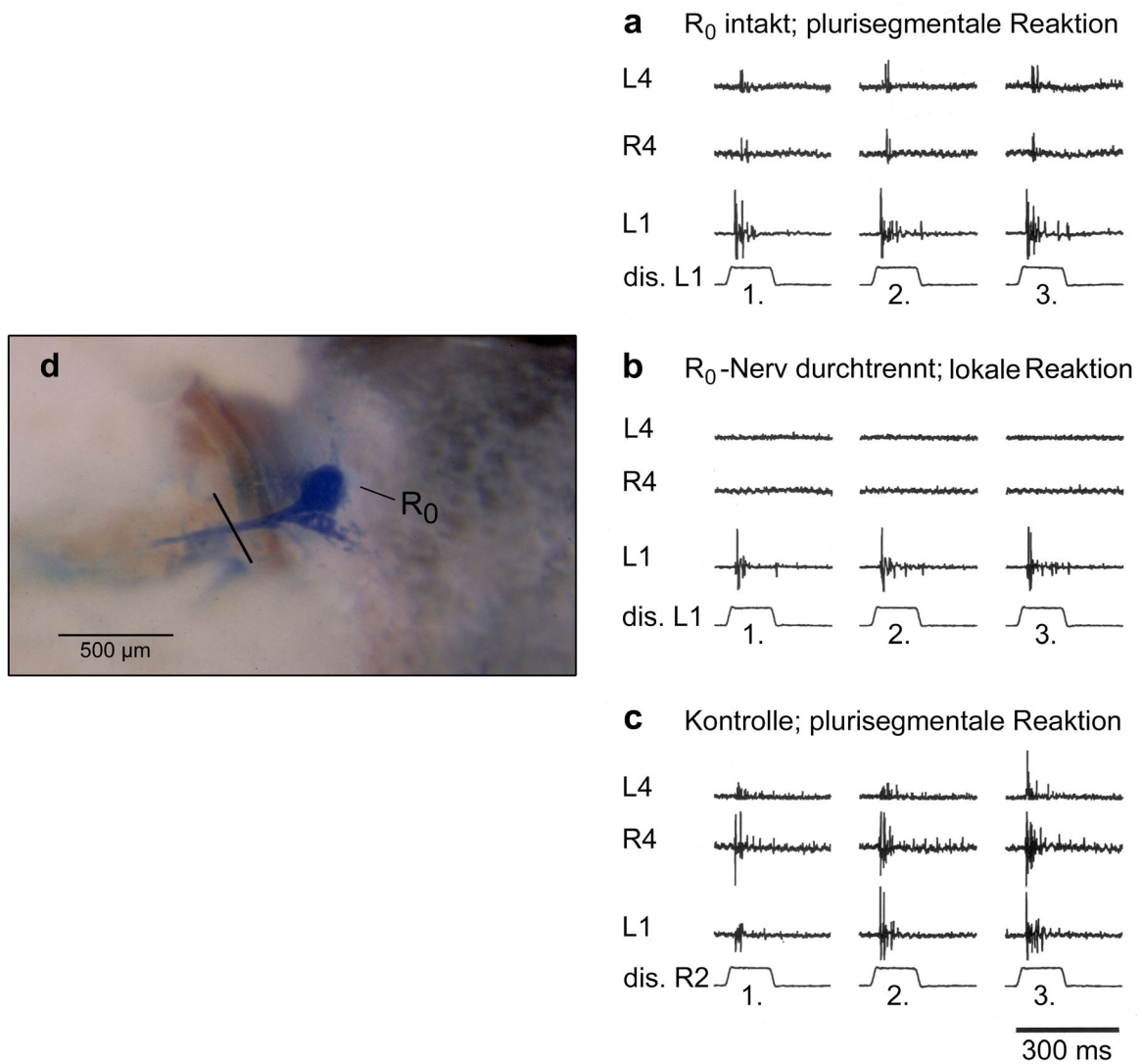


Abb. 21 Ausschaltversuche belegen, dass der intakte interne Gelenkrezeptor R_0 für das Zustandekommen der plurisegmentalen Reaktion unentbehrlich ist. Gezeigt werden jeweils 3 aufeinanderfolgende Elektromyogramme (1. – 3.) des $c2$ -Muskels von $L1$ und der beiden Hinterbeine $L4$ und $R4$. **(a)** Eine passive Bewegung der Coxa von $L1$ (dis. $L1$) mit intaktem Gelenkrezeptor R_0 bewirkt eine plurisegmentale Reaktion im $c2$ -Muskel der Hinterbeine. **(b)** Ist jedoch der sensorische Nerv des Gelenkrezeptors operativ durchtrennt, bleibt bei gleicher Reizung (dis. $L1$) die plurisegmentale Reaktion in den Hinterbeinen aus: Es erfolgt allein die lokale Reaktion im $c2$ des gereizten Beines. (Registrierung am Tag nach der Nervdurchtrennung). **(c)** Hier erfolgte zur Kontrolle lediglich ein Schnitt in die Pleuralmembran der Coxa von $L2$, ohne den sensorischen R_0 -Nerv zu verletzen. Die passive Bewegung der Coxa von $L2$ (dis. $L2$) bewirkt nach wie vor eine plurisegmentale Reaktion. **(d)** Dorsale Ansicht von R_0 nach „Umklappen“ der Pleura in die Bildebene, die Stelle der Nervdurchtrennung ist markiert (Methylenblau-Oberflächen-Färbung).

Ist jedoch der R_0 -Nerv, wie in **Abb. 21d** gezeigt, operativ durchtrennt worden, bleibt die plurisegmentale Antwort in den Hinterbeinen aus. Es kommt allein zu einer lokalen Reaktion

im $c2$ der bewegten Coxa, nämlich in L1. In **Abb. 21c** wird die Kontrollsituation im selben Tier gezeigt, bei der die Gelenkhaut der Coxa des 2. rechten Beines so flach eingeschnitten wurde, dass der Gelenkrezeptor intakt blieb. Tatsächlich führt die passive Bewegung dieser Coxa (**dis. R2**) mit intaktem R_0 auch zu einer plurisegmentalen Muskelantwort. Diese Experimente weisen den internen Gelenkrezeptor R_0 als notwendiges „Bindeglied“ zwischen lokaler und plurisegmentaler Reaktion aus. Der adäquate Reiz für den in die Gelenkhaut des Prosoma-Coxa-Gelenkes eingebetteten Gelenkrezeptor ist die Bewegung desselben. Sie wird normalerweise durch die lokale Reaktion hervorgerufen, d. h. bei Kontraktion des $c2$ -Muskels.

2. Die Lage der R_0 -Sinneszellen im 1.–3. Beinpaar unterscheidet sich von der im Hinterbeinpaar

Situation in den Beinpaaren 1–3: **Abbildung 22a** zeigt die Lage von R_0 im Prosoma-Coxa-Gelenk von zwei rechten Vorderbeinen (**R2** und **R3**). Das Sinnesorgan besteht hier aus einem kompakten sensorischen Ganglion (maximaler Durchmesser ca. 250 μm , minimaler Durchmesser ca. 100 μm). In **Abb. 22b** wird detaillierter gezeigt, wie der Gelenkrezeptor mit seiner vermeindlichen Dendritenregion in die Hypodermis der dorsalen medianen Gelenkmembran eingebettet liegt. Hier weist die Gelenkmembran vermehrt schwarze Pigmenteinlagerungen auf. Ansonsten wird das Ganglion frei vom Hämolympхраum umgeben.

Die Axone der sich im Ganglion befindlichen Sinneszellen sind in einem dünnen sensorischen Nerven zusammengefasst, der in unmittelbarer Nähe zur $c2$ -Muskel-Hinterseite verläuft. Nach einer Strecke von 1,5–2 mm tritt der Nerv in den motorischen $c2$ -Nerv über. Nach weiteren 5 mm erfolgt der Übergang ins ZNS.

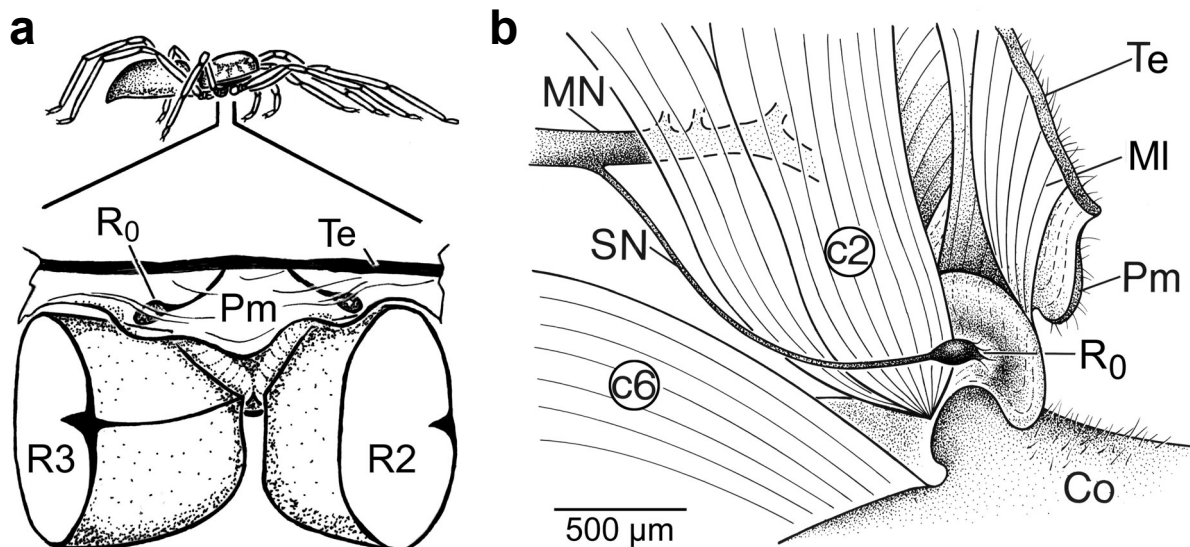


Abb.22 Lage des internen Gelenkrezeptors (R_0) im Prosoma-Coxa-Gelenk mit Anordnung des Nerven und der umgebenden Muskulatur. **(a)** Rechte Seitenansicht der Spinne mit vergrößertem Ausschnitt zwischen den Coxen des 3. (R_3) und 2. (R_2) Beines: R_0 liegt jeweils an der mittleren dorsalen Wölbung der Coxa, eingebettet in die flexible Pleuralmembran (Pm), nahe des distalen Coxarandes. **(b)** Schematisierte posteriore Ansicht eines rechten Prosoma-Coxa-Gelenks: die Axone von R_0 bilden einen dünnen sensorischen Nerv (SN) der sich mit dem dickeren motorischen Nerv (MN) von $c2$ vereinigt und dann weiter zentralwärts Richtung Unterschlundganglion verläuft. Te : Tergum; MI : Lateral-muskulatur; $c2$: anteriorer Levator der Coxa (Co); $c6$: endo-sternaler Remotor der Coxa. (Coxa-Muskel $c3$, eine Sehne, sowie der Darmblindsack wurden entfernt.) Muskelnomenklatur nach Palmgren (1978)

Bei einer $NiCl_2$ Anfüllung des R_0 -Nerven eines Vorderbeins, ganglionwärts, wurde eine Sinneszelle (30 μm im Durchmesser) im Zentrum des sensorischen Ganglions deutlich angefärbt. Mehrere Axone im Nerv waren jedoch nur bruchstückhaft, nicht durchgängig gefärbt. **Abbildung 23a** zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme des Ganglions als Whole-mount-Präparat mit dem angefärbtem Sinneszellsoma. Wie in **Abb. 23b** zu erkennen, wurden jedoch beim Fokussieren im Phasenkontrast des Mikroskops noch drei kleinere Sinneszellen (2 x 12 μm , 1 x 25 μm im Durchmesser) sichtbar. Von der Größe dieser Sinneszellen und der des Ganglions ausgehend, könnten insgesamt schätzungsweise 20 Sinneszellen enthalten sein. Es fällt auf, dass die Sinneszellen unterschiedlich geformt sind: die größte und die 2 kleinsten wirken multipolar, die mittlere, 25- μm -breite Sinneszelle sieht dagegen bipolar aus. In den Kernen der Sinneszellen ist jeweils deutlich ein Nucleolus zu erkennen.

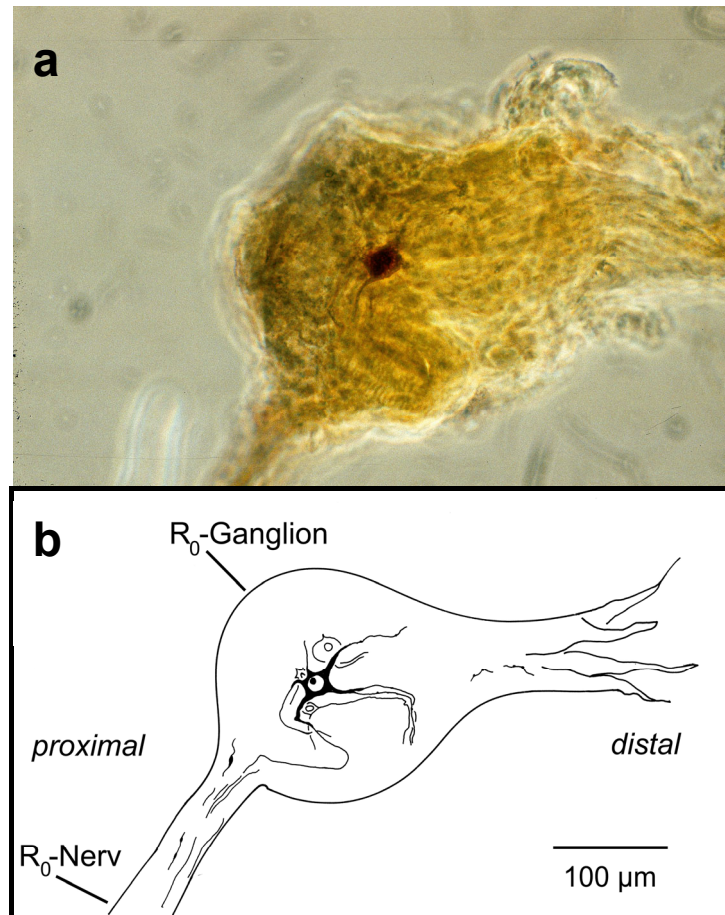


Abb. 23 Das R_0 -Ganglion der Beinpaare 1–3 besteht aus einer bindegewebigen Hülle mit einer Ansammlung von Sinneszellsomata und deren Dendriten. **(a)** Isoliertes R_0 -Ganglion mit angefärbtem multipolarem Sinneszellsoma im Zentrum (Füllung des R_0 -Nervs ganglionwärts mit NiCl_2). **(b)** Schematische Darstellung 3 weiterer kleinerer Sinneszellen, die beim Fokussieren mit dem Mikroskop noch zu erkennen sind. Auch die feinen Fortsätze (Dendriten) treten deutlicher hervor.

Hinterbeinsituation: Für die Gelenkrezeptoren in den Prosoma-Coxa-Gelenken der 4. Beine fehlt ein Gelenkrezeptor an korrespondierender Stelle, also dort, wo sich das Sinnesorgan in den Beinen 1-3 befindet. Vielmehr liegt R_0 der Hinterbeine am antero-dorsalen Coxarand, zwischen $c2$ -Muskel-Vorderseite und Gelenkmembran. Die Sinneszellen sind nicht ganglionär organisiert, sondern liegen als Ansammlung, nahe der $c2$ -Nerv-Aufgabelung, ohne eine gemeinsame bindegewebige Hülle, frei flottierend in der Hämolymphe vor. **Abbildung 24** zeigt ein silberintensiviertes Präparat, in dem einzelne spindelförmige Sinneszellen zu erkennen sind. Insgesamt sind ca. 20 Sinneszellen in dieser Ansammlung ausmachbar.

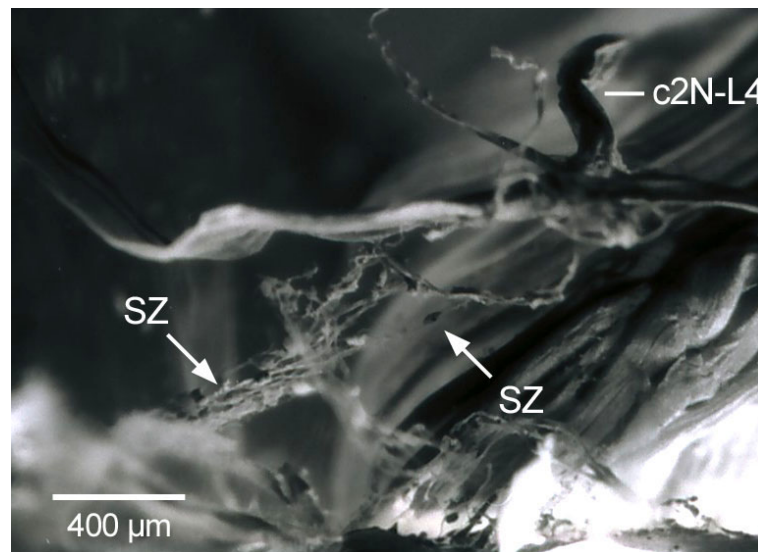


Abb. 24 R_0 im Prosoma-Coxa-Gelenk in den Hinterbeinen ($L4$, $R4$) besteht aus einer Ansammlung aus einzelnen bipolaren Sinneszellen (SZ) ohne Bindegewebshülle (linkes Hinterbein, anteriore Sicht). Die Gelenkmembran wurde eröffnet und entfernt. Rechts im Bild sind dicke A-Fasern des $c2$ -Muskels zu sehen. Die Sinneszellen liegen in unmittelbarer Nähe zum $c2$ -Nerv ($c2N-L4$). Etwas lateral im Sinneszellsoma ist ein dunkler Nucleus zu erkennen.

3. Zentrale R_0 -Projektionen verlaufen plurisegmental und kontralateral

Bei allen Präparaten ($N = 10$) der R_0 -Nervfüllungen projizierte nur eine gefüllte Faser ins ZNS. Im Nerv dagegen befanden sich immer mehrere gefüllte und gefärbte Profile. Inwieweit diese Projektion vielleicht der dicksten R_0 -Faser im Nerv entspricht, wird später diskutiert. In **Abb. 25** sind vier zentrale Projektionen von R_0 -Nervfüllungen aus Vorderbeinen mit verschiedenen Tracern dargestellt (in dorsaler Aufsicht). Die Faser mündet jeweils weit dorsal ins entsprechende Beinneuromer, verläuft danach parallel zum vorderseitigen Septum und spaltet sich kurz vor der Mittellinie in einen nach vorn und einen nach hinten projizierenden Ast auf. Mit einer Kommissur durch einen transversalen Trakt zieht die Faser jeweils in die kontralaterale ZNS-Hälfte. **Abb. 25d** zeigt eine am weitesten reichende Projektion, bei der es kontralateral ebenfalls zu einer plurisegmentalen Aufspaltung in anteriore und posteriore ZNS-Bereiche kommt.

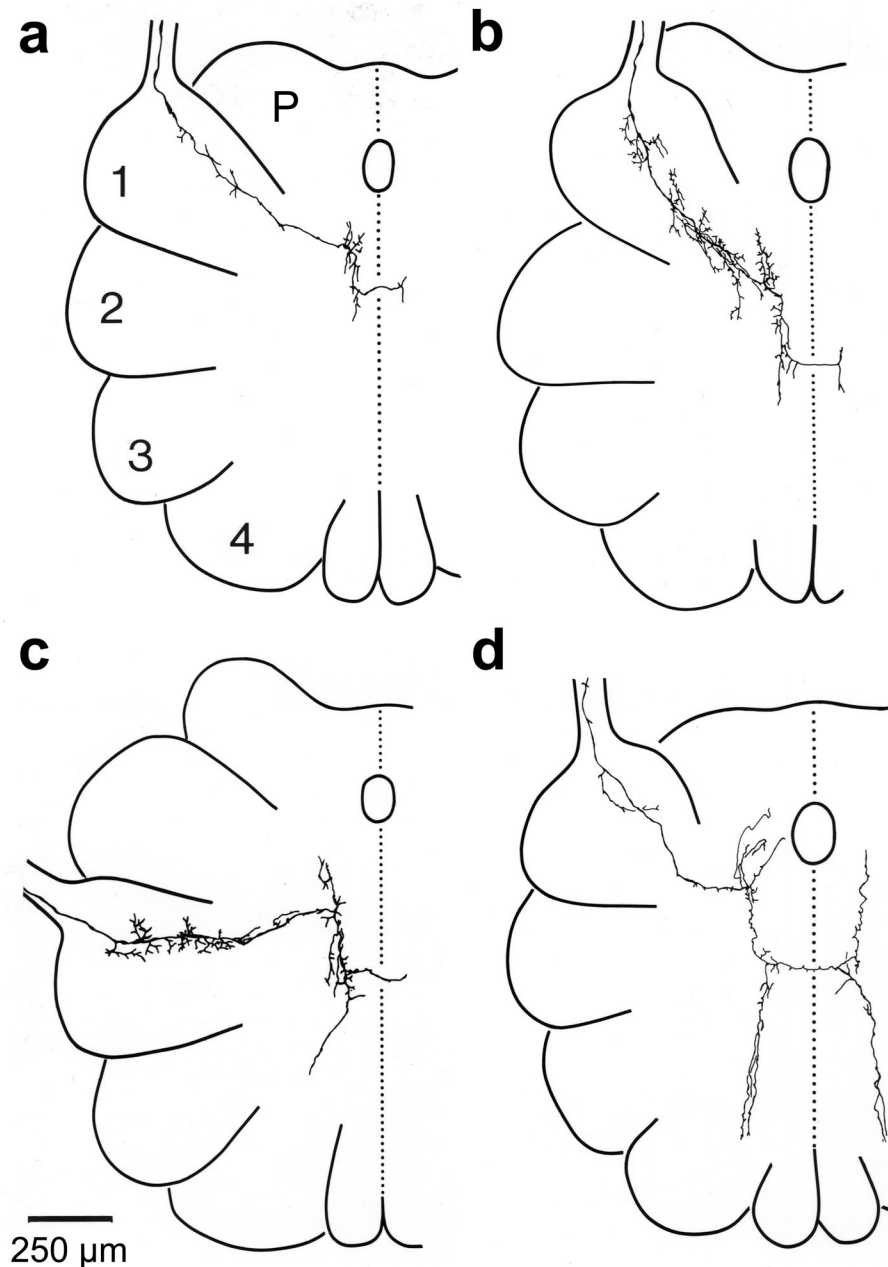


Abb. 25 Zentrale Projektionsgebiete von R_0 -Fasern im fusionierten Unterschlundganglien (USG)-Komplex nach Backfills des sensorischen R_0 -Nervs (siehe **Abb. 22, SN**). Zu erkennen sind jeweils die Ausmaße der Bein-Neuromere (**1 – 4**), des Pedipalpen-Neuromers (**P**) und gepunktet die longitudinale Mittellinie des USG-Komplexes, die rostral durch den ovalen Anschnitt des Oesophagus unterbrochen wird (Rekonstruktionen aus 20 μm -Horizontal-Serien-Schnitten durch das ZNS, in dorsaler Ansicht). (**a**) sensorische Endigungen einer R_0 -Faser nach NiCl_2 -Füllung des R_0 -Nervs im linken Vorderbein. Die Faser verläuft zunächst mit feinen Aufzweigungen im ipsilateralen Neuromer (**L1**). In der Mitte des USG, parallel zur Mittellinie, spaltet sie sich in einen rostralen und abdominalen Ast auf und verläuft zwischen 1. und 2. Beinneuromer mit einer Kommissur in die kontralaterale USG-Hälfte. (**b – d**) Weitere Beispiele sensorischer R_0 -Faser-Projektionen in anderen Spinnen mit jeweils weitreichender Füllung. (**b**) Co-Lysin Füllung in **L1**, (**c**) CoCl_2 -Füllung in **L2**, (**d**) Füllung mit CoCl_2 + Bovine-Serum-Albumin (BSA) in **L1**. Man beachte die fast spiegelsymmetrische „H“-förmige Projektion.

Allerdings gab es auch Präparate bei denen sich die Aufzweigungen auf die ipsilaterale ZNS-Hälfte beschränken. **Abb. 26** zeigt ein solches Präparat. In den dorsalen Projektionsgebieten weist die Faser in den Bereichen der feinen Verzweigungen variköse Anschwellungen auf. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um sogenannte „Blebs“, die synaptische Ausgangsregionen darstellen (Tyrer und Altman 1974).

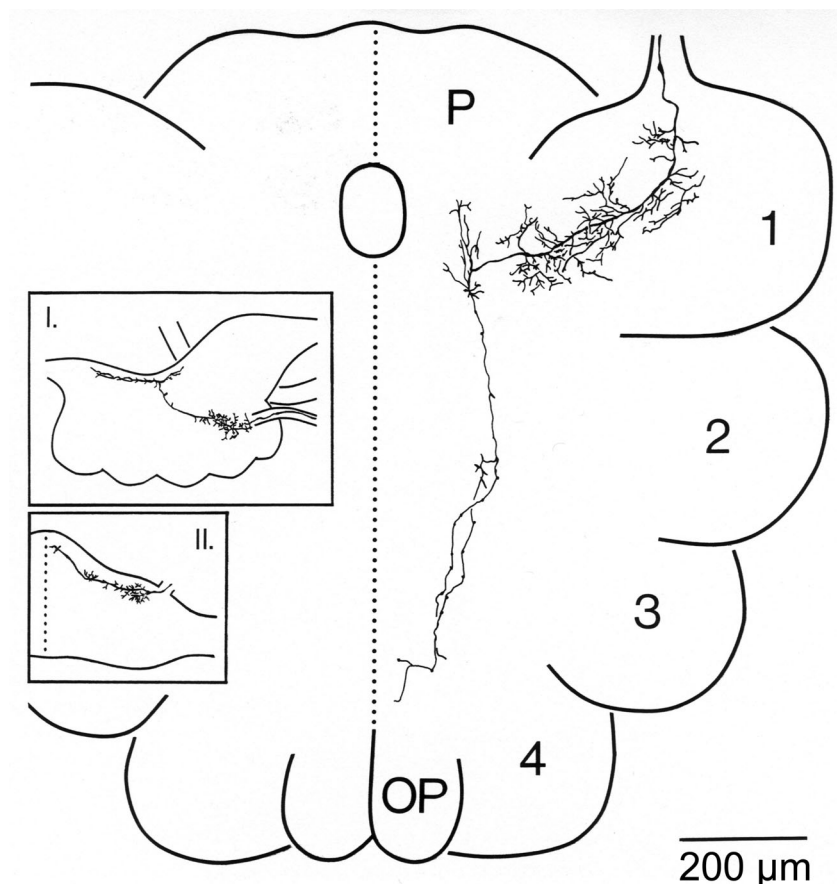


Abb. 26 Beispiel für eine plurisegmentale, nicht aber kontralateral projizierende R₀-Faser im USG-Komplex (Rekonstruktion aus 20 µm-Horizontal-Serien-Schnitten durch das ZNS nach NiCl₂-Backfilling des R₀-Nervs in **RI**, dorsale Ansicht). Die beiden Insetts zeigen zusätzlich die sagittale (**I.**) und frontale (**II.**) Perspektive der Projektion. Beachtenswert sind die massiven lokalen Verzweigungen im ipsilateralen Neuromer und der lange plurisegmentale Ausläufer bis ins dorsale Neuropil. **P**: Pedipalpen-Neuromer; **OP**: opistosomales Neuromer; **1, 2, 3, 4**: 1.–4. Beinneuromere

4. Der R₀-Nerv setzt sich aus ca. 200 Axon-Profilen zusammen

Der Durchmesser des Nerven beträgt ungefähr 25 µm. Überraschenderweise besteht er aus einer dichtgepackten Ansammlung von ca. 200 Axonquerschnitten. **Abbildung 27a** zeigt die Organisation des R₀-Nervs im Ultra-Dünnschnitt (Schnittposition ca. 0,5 mm vor dem Ganglion). Der Nerv wird durch eine Hülle aus Gliazellen umgeben, deren Kerne im Anschnitt zu erkennen sind. Axon-Querschnitte verteilen sich in mehreren (12) Kompartimenten über den gesamten Nervenquerschnitt. Es kommen Axondurchmesser von weniger als 0,5 µm bis maximal 3 µm vor. Unter der Annahme, dass die einzelne, gefüllte Projektion bei den Backfills mit der weitulmigsten Faser (3 µm) im Querschnitt des R₀-Nervs korrespondiert, wäre hier ein Hinweis auf die Lage und Gesamtzahl der dem sensorischen Ganglion zugehörigen Fasern im Nerv. Den entsprechenden Faserquerschnitt und das in Frage kommende Kompartiment habe ich in der **Abb. 27a** gekennzeichnet und umrahmt. Demnach würden insgesamt 10 große (1–3 µm) und 15 kleine (< 1 µm) Faser-Querschnitte zum sensorischen Ganglion gehören, eine Zahl, die nahe bei der von mir geschätzten Sinneszellanzahl (ca. 20) für das Ganglion liegt.

Faser-Querschnitte, die Filamente und dunkle Sekretgranula enthalten, sind über den gesamten Nerven verteilt. Die meisten Umrisse sind oval bis kreisrund. In dem direkt unterhalb des potentiellen R₀-Felds angrenzenden Kompartiment, kommen die meisten (ca. 100) und kleinsten Axonquerschnitte pro Kompartiment vor. Teilweise (ca. 40) besitzen sie Umrisse von auffallend wabenartiger Struktur, die, angefüllt mit Filamenten, dicht aneinander grenzen.

Wie das Wholemound-Präparat nach NiCl₂-Füllung des R₀-Nervs in **Abb. 27b** zeigt, verlaufen auf, entlang und parallel zum Nerven feine Fasern mit stellenweisen Verdickungen und Verjüngungen. Es wird deutlich, dass die Fasern auch das gesamte Ganglion und die vermeindliche Dendritenregion umspinnen. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um begleitende efferente Fasern zentralen Ursprungs (siehe Diskussion).

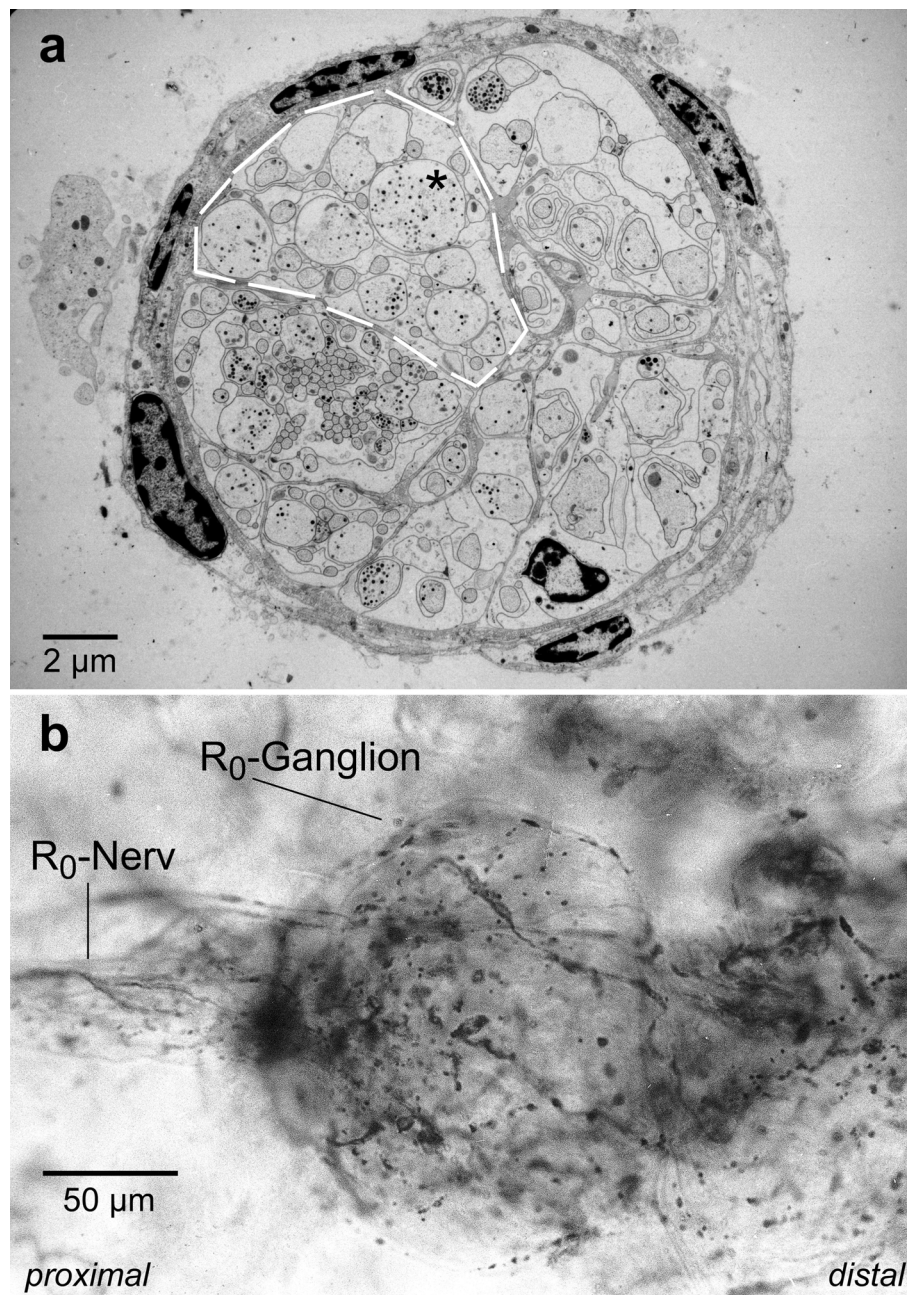


Abb. 27 Während der R₀-Nerv Axone in großer Anzahl enthält, wird das R₀-Ganglion selbst von mehreren feinen Fasern „umspinnen“. **(a)** Elektronenmikroskopische Aufnahme des R₀-Nervs im Querschnitt. Zirka 200 Axon-Profile verschiedenen Umrisses verteilen sich auf mehrere Kompartimente. Bei „9 Uhr“ fällt eine lückenlose Anhäufung besonders dünner Querschnitte mit teils wabenförmiger Umwandung besonders auf. Möglicherweise entspricht der größte Querschnitt (Sternchen) von fast 3 µm der R₀-Faser, die bei den Backfills angefüllt wurde (siehe **Abb. 23**). Dann würde dieses Kompartiment (umrahmt) zu R₀ gehören. Einige größere Querschnitte enthalten dunkle kreisförmige Sekretgranula. **(b)** Entlang des Nerven und um das Ganglion herum verläuft ein Netz vermutlich efferenter Fasern mit punktuellen Anschwellungen (Varikositäten) (Füllung des R₀-Nervs mit NiCl₂, ganglionwärts).

Diskussion

1. Vergleich von R_0 mit weiteren Gelenkrezeptoren im Spinnenbein

Meine Ergebnisse zu R_0 reihen sich in die bisher bekannten Beobachtungen zu internen Gelenkrezeptoren in Spinnenbeinen ein (Parry 1960; Rathmayer 1967; Rathmayer und Koopmann 1970; Seyfarth und Pflüger 1984; Seyfarth, Eckweiler und Hammer 1985). Im Folgenden gehe ich vergleichend auf einzelne anatomische und funktionelle Punkte ein:

R_0 liegt jeweils an den Drehpunkten der Coxa: Das R_0 -Ganglion der Beinpaare 1–3 liegt, wie auch die der bisher beschriebenen Gelenkrezeptoren, nicht in dem Beinglied, dessen Bewegung perzipiert wird, sondern in dem sich der verbindenden flexiblen Gelenkhaut anschließenden Gelenkteil davor, nämlich dem Prosoma. Desweiteren liegen die Ganglien immer in der Nähe der „Gelenkköpfe“ (Barth 2001). Es sind, wie Rathmayer und Koopmann (1970) formulieren, die „strategisch wichtigen Drehpunkte“. Dies sind die Stellen, an denen bei der Bewegung bevorzugt Druck- und Scherkräfte auftreten. Die Tatsache, dass sich die Lage von R_0 in den Beinpaaren 1–3 von der im Hinterbeingelenk unterscheidet, lässt somit auf eine unterschiedliche Bewegungsweise dieser Beine schließen. Meine Messungen zum horizontalen Coxawinkel bestätigen diese Annahme (siehe **Abb. 19**). Bei der Betrachtung der Coxa-Gelenkachsen (Eckweiler 1987) fällt auf, dass die Orte zweier ihrer Drehpunkte genau mit der Lage des sensorischen Ganglions (Coxarand, dorso-median) bzw. der Sinneszellen (Coxarand, anterior-median) korrespondieren. In den Beinpaaren 1–3 würde demnach die Coxa bevorzugt in ihrer Längsachse gedreht und im Hinterbeinpaar vor allem in ihrer Querachse bewegt werden. Die resultierenden Bewegungsabläufe können für die Vorderbeine mit „vor und zurück“ und „rotierend“ und für das Hinterbeinpaar mit „hoch und runter“, „beugend und streckend“ beschrieben werden. Es besteht die Vorstellung, dass durch solche Bewegung im Gelenk Scherkräfte auf das „Maschenwerk“ der Dendriten über Bündel von Microtubuli in den Hypodermiszellen übertragen werden (Foelix und Choms 1979).

Form und Arbeitsbereiche der Sinneszellen sind unterschiedlich: Die Sinneszellen von R₀ bei *C. salei* weisen verschiedene Größen und Formen (stern- und spindelförmig) auf. Innerhalb der Ganglien R_{10, 17, 18} von *Dugesia hertzi* treten ebenfalls verschiedene Größenordnungen von Sinneszellen auf (Rathmayer und Koopmann 1970): Zwei sind dabei stets größer (45 µm) als die anderen (30 µm). Rathmayer und Koopmann (1970) machen bei R₈ (11–13 Sinneszellen) auch die Beobachtung, dass ein bis zwei deutlich größere (55–60 µm) Sinneszellen außerhalb einer Bindegewebshülle liegen. Wie Dünnschnitte belegten, ist eine dieser Zellen multipolaren Typs.

Zur funktionellen Einteilung der Sinneszellen führten Nervenableitungen mit ihrem zeitlichen Erregungsmuster bei Bewegung des Gelenkes (Rathmayer 1967; Harris und Mill 1977). Es konnten Rezeptoren, die die Beinbewegung (Bewegungsrezeptoren) und solche, die die Beinstellung (Stellungsrezeptoren) anzeigen, unterschieden werden. Weiterhin weisen die Sinneszellen noch unterschiedliche Arbeitsbereiche auf: Es gibt Neurone, die über den gesamten möglichen Bereich der Gelenkbewegung ansprechen und andere, die wiederum ab oder bis zu einem bestimmten Winkelgrad der Auslenkung kodieren. Ähnliches ist für R₀ und die Bewegung des Prosoma-Coxa-Gelenkes zu erwarten (siehe Ausblick).

2. Zentraler Verschaltungsweg für Meldungen von R₀

Wie die Ergebnisse der Backfills des R₀-Nerven zeigen, verlaufen die Projektionen in weit dorsal gelegenen Anteilen des ZNS. Auch Leise (1991) bestätigt bei Crustaceen, dass propriozeptive Axone stets in dorso-medianen sensorischen Longitudinaltrakten des ZNS verlaufen. In diesen dorsalen Trakten waren auch die als synaptische Ausgangsregionen interpretierten „Blebs“ zu beobachten. Wie ein Vergleich der zentralen Projektionsgebiete der c2-Motoneuronen und der R₀-Afferenzen zeigt, wäre eine direkte erregende (monosynaptische) Ver-

schaltung zwischen beiden anatomisch prinzipiell möglich. Die lange Latenz der plurisegmentalen Reaktion auf den Beginn des Bewegungsreizes von 21 ms spricht allerdings dagegen. Michael Kadel (1992) konnte zeigen, dass plurisegmentale Interneurone die plurisegmentale Muskelreaktion kontrollieren. Sie beeinflussen gleichzeitig mehrere neuromuskuläre Einheiten, vermutlich über „nicht-spikende“ lokale Interneurone.

Durch ihre plurisegmentalen Projektionen unterscheiden sich die R₀-Afferenzen von anderen untersuchten Mechanorezeptoren der Coxa: Die Projektionen der langen „glatten Haare“ (Eckweiler, Hammer und Seyfarth 1989) und der Borstenfeldsensillen (Seyfarth, Gnatzy und Hammer 1990) bleiben lokal im zugehörigen Beinneuromer.

Ein ähnlicher plurisegmentaler Beinreflex ist auch für den Hummer *Jasus lalandii* beschrieben (Clarac 1981). Die plurisegmentale Muskelantwort wird auch hier durch eine passive Bewegung des Thorax-Coxa-Gelenks ausgelöst.

3. Diskrepanz zwischen Sinneszellanzahl im Ganglion und Axonquerschnitten im Nerv: Hinweis auf periphere efferente Beeinflussung?

Angenommen, die Sinneszellanzahl von R₀ liegt bei ca. 20-25, dann sind die Axonquerschnitte im Nerv stark überzählig. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier u. a. auch um Querschnitte vermutlich efferenter Fasern zentralen Ursprungs, welche die Aktivität des Sinnesorgans peripher modulieren können.

Es gibt mehrere Hinweise auf efferente periphere Inhibition bei Spinnen: Foelix und Choms (1979) konnten elektronenmikroskopisch an Gelenkrezeptoren (R₁₀) von *C. salei* und *Z. x-notata* nachweisen, dass sowohl den Somata als auch den Dendriten andere Nervenfasern synaptisch aufgeschaltet sind. 25 µm distal vom Ganglion zählen sie 50 afferente und 25 efferente Fasern. Die efferenten Fasern durchqueren das Ganglion und beinhalten „typische“

dunkle neurosekretorische Granula: eine Beobachtung, die auch ich im Nervenquerschnitt von R₀ machen konnte. Auch andere Mechanorezeptoren, nämlich Haarsensillen und Spaltsinnesorgane (VS-3 auf der Patella) erhalten ähnliche periphere synaptische Kontakte (Seyfarth 1985; Fabian-Fine 1999; Fabian-Fine, Meinertzhagen und Seyfarth 2000). Das optische Bild der punktuellen Verteilung Synapsin- und GABA-ähnlicher-Immunreaktivität entlang eines internen Gelenkrezeptors von *C. salei* (Fabian-Fine, Seyfarth und Meinertzhagen 2002) ist sehr ähnlich zu dem Bild der punktuellen Anschwellungen entlang des R₀-Nervs und um das R₀-Ganglion nach anterograder NiCl₂-Füllung (siehe **Abb. 26b**). Insgesamt sind durch periphere Innervation mehrere Wege der Beeinflussung der R₀-Neurone denkbar, die z. B. zu einer Empfindlichkeitsänderung der Sinneszellen führen können (Fabian-Fine, Seyfarth und Meinertzhagen 2002). Durch synaptische Hemmung der Sinneszellen könnte das gesamte Sinnesorgan, z. B. während bestimmter Laufphasen, „abgeschaltet“ werden.

Auch Muskelrezeptororgane werden efferent inhibiert: Weitere Sinnesorgane, die eine ausgedehnte efferente synaptische Innervation in der Peripherie erhalten, sind z. B. Muskelrezeptororgane (MRO) bei Crustaceen (Iwasaki et al. 2001; Fabian-Fine, Seyfarth und Meinertzhagen 2002). Beim abdominalen Streckrezeptor des Flußkrebs sind die dendritischen Endigungen der mechanorezeptiven Sinneszellen in die beiden Rezeptor-Muskelfasern eingebettet und werden bei deren Dehnung gereizt. Bei Erregung des begleitenden gemeinsamen efferenten GABAergen inhibitorischen Axons wird die Antwort des Rezeptors auf einen Streckreiz gehemmt (Reichert 2000). Die Existenz von MROs bei Spinnen wurde zwischenzeitlich immer mal wieder vermutet, konnte allerdings bisher nicht eindeutig bewiesen werden. Rathmayer und Koopmann (1970) erwähnen als unbekannte Rezeptorengruppe am Bein der Vogelspinne 2 Gruppen von Sinneszellen, die in Verbindung von „akzessorischen“ Muskeln stehen und deren Dendriten in einer Sehne enden.

Diskrepanz zwischen Faseranzahl im Nerv und zentraler Projektion: Die Ergebnisse der Backfills, zentral- und ganglionwärts, widersprechen der Anzahl von Axonquerschnitten im R₀-Nerv. Obwohl der R₀-Nerv im Querschnitt ca. 200 Profile aufweist, erhielt ich bei den Backfills nur eine zentrale Projektion bzw. nur ein gut angefülltes Rezeptorsoma. Dies kann Ausdruck methodischer Grenzen sein: die sehr dünnen Axonquerschnitte wurden beim Durchschneiden des Nerts gequetscht. Die Faser, die trotzdem angefärbt wurde, könnte dem weitleumigsten Querschnitt (3 µm) im Nerv entsprechen. Desweiteren muss beachtet werden, dass die verwendeten Tracersubstanzen Gewebe-toxisch sind und die sehr dünnen sensorischen Axone besonders von dieser Giftigkeit betroffen sind. Zusätzlich ist die Laufzeit der Tracersubstanz ein Wettlauf gegen die parallel eintretenden Degenerationsprozesse: nachdem das Spinnen-Prosoma mit seinem offenen Blutgefäßsystem präparatorisch eröffnet wurde, endet die Sauerstoffzufuhr abrupt, ganz im Gegensatz etwa zu vergleichbaren Präparationen an Insekten, wo noch post mortem ein Sauerstofftransport über das intakte Tracheensystem gewährleistet ist.

4. Ausblick

Aus der vorgenommenen Charakterisierung des internen Gelenkrezeptors ergeben sich zur weiteren Aufklärung mehrere methodische Ansätze:

1. Wie bereits erwähnt, stellen die verwendeten Tracer bei den Anfüllungen des Nerven einen hohen Giftigkeitsfaktor dar. Mittlerweile haben sich Methoden zur Darstellung zentralnervöser Projektionen mit weniger- bzw. nicht-toxischen neuronalen Tracersubstanzen etabliert (Daberkow und Vaughan 1996). R₀-Nervfüllungen durch Dextranskonjugate mit Fluorochromen (Rhodamin) oder Biotin, sollten mehr Klarheit über die Anzahl zentral-projizierender Fasern und Sinneszellen im Ganglion liefern.

2. GABA-Immunmarkierungen (Immuno-Gold) an licht- und elektronenmikroskopischen Querschnitten des R₀-Nervens (Bereich Axonhügel) und des sensorischen R₀-Ganglions könnten zur Identifizierung der vermuteten Efferenzen beitragen.

3. Zur Registrierung der elektrischen Eigenschaften der R₀-Sinneszellen und zur Identifizierung von phasischen und tonischen Einheiten müsste eine Versuchsanordnung und ein R₀-Präparat ähnlich dem von Seyfarth und Pflüger (1984) entwickelt werden, das extrazelluläre Ableitungen am R₀-Nerv mit Saugelektroden möglich macht. Gleichzeitig sollte die Coxa mechanisch zu reizen, bzw. in unterschiedliche Richtungen zu bewegen sein. Für ein Vorder- und Hinterbein im Vergleich könnte dann die maximale Entladungsfrequenz der abgeleiteten Einheiten festgestellt und Rückschlüsse auf die Präferenzstellung bzw. -bewegung des Gelenkes gezogen werden (Flexion, Extension, Adduktion).

Literaturverzeichnis

- Altman JS, Tyrer NM (1980) Filling selected neurons with cobalt through cut axons. In: Stausfeld NJ, Miller TA (eds) Neuroanatomical techniques. Insect nervous system. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 373–402
- Altringham JD, Johnston IA (1982) The pCa-tension and force-velocity characteristics of skinned fibers isolated from fish fast and slow muscles. *J Physiol* 333:159–176
- Antonsen BL, Paul D (2000) The leg depressor and levator muscles in the squat lobster *Munida quatrispina* (Galatheidae) and the crayfish *Procambarus clarkii* (Astacidae) have multiple heads with potentially different functions. *Brain Behav Evol* 56:63–85
- Baattrup E, Bayley M (1993) Effects of the pyrethroid insecticide Cypermethrin on the locomotor activity of the wolf spider *Pardosa amentata*: quantitative analysis employing computer-automated video tracking. *Ecotoxicol Environ Saf* 26:138–152
- Babu KS (1985) Patterns of arrangement and connectivity in the central nervous system of arachnids. In: Barth FG (ed) Neurobiology of arachnids. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 3–19
- Bacon JP, Altman JS (1977) A silver intensification method for cobalt-filled neurones in wholemount preparations. *Brain Res* 138:359–363
- Bárány M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197–218
- Barnes WJP, Barth FG (1991) Sensory control of locomotor mode in semi-aquatic spiders. In: Armstrong DM, Bush BMH (eds) Locomotor neural mechanisms in arthropods and vertebrates. Manchester University Press, Manchester and New York, pp 105–116
- Barth FG (2001) Sinne und Verhalten: aus dem Leben einer Spinne. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Barth FG, Seyfarth E-A, Bleckmann H, Schüch W (1988) Spiders of the genus *Cupiennius* Simon 1891 (Araneae, Ctenidae) I. Range distribution, dwelling plants, and climatic characteristics of the habitats. *Oecologia* 77:187–193
- Bauer K-H (1972) Funktionsmechanismus der Autotomie bei Spinnen (Araneae) und seine morphologischen Voraussetzungen. *Z Morph Tiere* 72:173–202
- Beinbrech G, Meller U, Sasse W (1985) Paramyosin content and thick filament structure in insect muscles. *Cell Tissue Res* 241:607–614

- Bickeböller C, Galler S, Seyfarth E-A (1989) Fiber composition of spider muscle: behavioral implications. In: Erber J, Menzel R, Pflüger H-J, Todt D (eds) Neural mechanisms of behavior. Proc 2nd intern congr neuroethology. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, p 33
- Bickeböller C, Kadel M, Seyfarth E-A (1991) Coxal muscle c2 in spiders: identification of motoneurons, joint receptors, and their role in body raising behavior. In: Elsner N, Penzlin H (eds) Synapse – transmission modulation. Proc 19th Göttingen neurobiology conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, p 59
- Blickhan R und Barth FG (1985) Strains in the exoskeleton of spiders. J Comp Physiol A 157:115–147
- Bowdan E (1976) The functional anatomy of the mesothoracic leg of the waterstrider, *Gerris remigis* Say (Heteroptera). Psyche 83:289–303
- Brenner HR (1972) Evidence for peripheral inhibition in an arachnid muscle. J Comp Physiol 80:227–231
- Breuer H (1978) Physik für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosin triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. J Histochem Cytochem 18:670–672
- Brüstle B, Kreissl S, Mykles D, Rathmayer W (2001) A novel mechanism for the neuropeptide proctolin in crustacean muscle: phosphorylation of a myofibrillar 30 kDa protein. In: Elsner N, Kreutzberg GW (eds) Göttingen neurobiology report. Proceedings of the 4th meeting of the german neuroscience society 2001. Vol II 28th Göttingen neurobiology conference. p 798
- Bullard B, Leonard K, Larkins A, Butcher G, Karlik C, Fyrberg E (1988) Troponin of asynchronous flight muscle. J Mol Biol 204:621–637
- Chapman G (1975) Versatility of hydraulic systems. J Exp Zool 194:249–270
- Clarac F (1981) Postural reflexes coordinating walking legs in a rock lobster. J Exp Biol 90:333–337
- Clarke J (1986) The comparative functional morphology of the leg joints and muscles of five spiders. Bull Br Arachnol Soc 7:37–47
- Collins JH, Jakes R, Kendrick-Jones J, Leszyk J, Barouch W, Theibert JL, Spiegel J, Szent-Györgyi AG (1986) Amino acid sequence of myosin essential light chain from the scallop *Aquiptecten irradians*. Biochemistry 25:7651–7656

- Daberkow DP, Vaughan DK (1996) Dextran backfill tracers combined with Lucifer Yellow injections for neuroanatomic studies of the leech head ganglion. *J Neurosci Meth* 67:149–155
- Dhoot GK, Perry SV (1979) Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 278:714–718
- Duncker PM (1992) Vorkommen und Verteilung biogener Amine im Zentralnervensystem der Jagdspinne *Cupiennius salei* Keyserling (Ctenide, Araneae, Arachnida). Diplomarbeit Universität Wien
- Eckweiler W (1987) Tasthaare, Beinmuskelreflexe und Einstellung der Körperhöhe bei Jagdspinnen. Dissertation, Universität Frankfurt am Main
- Eckweiler W, Seyfarth E-A (1988) Tactile hairs and the adjustment of body height in wandering spiders: behavior, leg reflexes, and afferent projections in the leg ganglia. *J Comp Physiol A* 162:611–621
- Eckweiler W, Hammer K, Seyfarth E-A (1989) Long, smooth hair sensilla on the spider leg coxa: sensory physiology, central projection pattern, and proprioceptive function (Arachnida, Araneida). *Zoomorph* 109:97–102
- Eisenberg BR (1985) Adaptability of ultrastructure in the mammalian muscle. *J Exp Biol* 115:55–68
- Epstein HF, Aronow BJ, Harris HE (1976) Myosin-paramyosin cofilaments: enzymatic interactions with F-actin. *Proc Natl Acad Sci* 76:3015–3019
- Fabian-Fine R (1999) Peripheral synapses at identified mechanosensory neurons in spiders: three-dimensional reconstruction and GABA immunocytochemistry. *J Neurosci* 19:298–310
- Fabian-Fine R, Meinertzhagen IA, Seyfarth E-A (2000) Organization of efferent peripheral synapses at mechanosensory neurons in spiders. *J Comp Neur* 420:195–210
- Fabian-Fine R, Seyfarth E-A, Meinertzhagen IA (2002) Peripheral synaptic contacts at mechanoreceptors in arachnids and crustaceans: morphological and immunocytochemical characteristics. *Microsc Res Tech* 58:283–298
- Federle W, Brainerd EL, McMahon TA, Hölldobler B (2001) Biomechanics of the movable pretarsal adhesive organ in ants and bees. *Proc Natl Acad Sci* 98:6215–6220
- Foelix RF (1992) *Biologie der Spinnen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Foelix RF, Choms A (1979) Fine structure of a spider joint receptor and associated synapses. *Eur J Cell Biol* 19:149–159

- Fourtner CR (1981) Role of muscle in insect posture and locomotion. In: Herreid CF, Fourtner CR (eds) Locomotion and energetics in arthropods. Plenum, New York London, pp 195–213
- Fowler WS, Neil DM (1992) Histochemical heterogeneity of fibers in the abdominal superficial flexor muscles of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). J Exp Zool 264:406–18
- Fröhlich A (1978) Der Lauf der Trichterspinnne *Agelena labyrinthica* Cl.. Verh Dtsch Zool Ges 1978, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p 244
- Fyrberg EA, Fyrberg CC, Biggs JR, Saville D, Beall CJ, Ketchum A (1998) Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. Biochem Genet 36:271–287
- Galler S (1989) Mechanische Untersuchungen an identifizierten, enthäuteten Muskelfasern des Schließers der Krabbe *Eriphia spinifrons*. Dissertation Universität Konstanz
- Galler S, Schmitt TL, Hilber K, Pette D (1997) Stretch activation and isoforms of myosin heavy chain and troponin-T of rat skeletal muscle fibres. J Muscle Res Cell Motil 18:555–561
- Garone L, Theibert JL, Miegel A, Maeda Y, Murphy C, Collins JH (1991) Lobster troponin C: amino acid sequences of three isoforms. Arch Biochem Biophys 291:89–91
- Gronenberg W (1987) Neuronal elements in the CNS of a spider (*Cupiennius salei*): anatomy and physiology. In: Elsner N, Creutzfeldt O (eds) New frontiers in brain research. Proc 15th Göttingen neurobiology conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, p 78
- Gruhn M (2000) Untersuchungen zur Muskelfaserdiversität und -plastizität an der Extensormuskulatur des Flusskrebse *Orconectes limosus* Raf.. Dissertation Universität Konstanz
- Gruhn M, Rathmayer W (2002) Phenotype plasticity in postural muscles of the crayfish *Orconectes limosus* Raf.: correlation of myofibrillar ATPase-based fiber typing with electrophysiological fiber properties and the effect of chronic nerve stimulation. J Exp Zool 293:127–140
- Günzel D, Galler S, Rathmayer W (1993) Fibre heterogeneity in the closer and opener muscles of crayfish walking legs. J Exp Biol 175:267–281
- Harris DJ, Mill PJ (1977) Observations on the leg receptors of *Ciniflo* (Araneida: Dictynidae). I. External mechanoreceptors. J Comp Physiol A 119:37–54
- Hart TF, Fourtner CR (1979) Histochemical analysis of physiologically and morphologically identified muscles in an insect leg. Comp Biochem Physiol 64:437–440

- Höger U, Seyfarth E-A (1995) Just in the nick of time: postembryonic development of tactile hairs and of tactile behavior in spiders. *Zoology* 99:49–57
- Holmes JM, Neil DM, Galler S, Hilber K (2002) Correlation of the synaptic and mechanical properties of two slow fibre phenotypes in a crustacean muscle. In: Wiese K (ed) *The crustacean nervous system*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 292–304
- Homberg U, Bleick A, Rathmayer W (1993) Immunocytochemistry of GABA and glutamic acid decarboxylase in the thoracic ganglion of the crab *Eriphia spinifrons*. *Cell Tiss Res* 271:279–288
- Horikawa K, Armstrong WE (1988) A versatile means of intracellular labelling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Meth* 25:1–11
- Hoyle G (1975) The neural control of skeletal muscles. In: Usherwood PNR (ed) *Insect muscle*. Academic Press, London, pp 501–543
- Huang Q, Zhou D, DiFiglia M (1992) NeurobiotinTM, a useful neuroanatomical tracer for in vivo anterograde, retrograde and transneuronal tract-tracing and for in vitro labeling of neurons. *J Neurosci Meth* 41:31–43
- Iwasaki M, Ohata A, Okada Y, Sekiguchi H, Niida A (2001) Functional organisation of anterior thoracic stretch receptors in the deep-sea isopod *Bathynomus doederleini*: behavioural, morphological and physiological studies. *J Exp Biol* 204:3411–3423
- Jahromi SS, Atwood HL (1969) Correlation of structure, speed of contraction, and total tension in fast and slow abdominal muscle fibers of the lobster (*Homarus americanus*). *J Exp Zool* 171:25–38
- Jahromi SS, Atwood HL (1971) Structural and contractile properties of lobster leg-muscle fibers. *J Exp Zool* 176:475–486
- Josephson RK, Stokes DR (1987) The contractile properties of a crab respiratory muscle. *J Exp Biol* 131:265–287
- Kadel M (1992) Zentralnervöse Korrelate lokaler und plurisegmentaler Muskelreflexe bei Spinnen: physiologische und morphologische Identifizierung von Einzelneuronen. Dissertation Universität Frankfurt am Main
- Kadel M, Bickeböller C, Seyfarth E-A (1989) Local and plurisegmental correlates of reflex activity in spiders. In: Elsner N, Singer W (eds) *Dynamics and plasticity in neuronal systems*. Proc 17th Göttingen neurobiology conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, p 118

- Katz B (1987) Nerv, Muskel und Synapse. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Keyserling E (1877) Über amerikanische Spinnenarten der Unterordnung Citigradae. Verh zool-bot Ges Wien 26:609–708
- Kobayashi T, Takagi T, Konishi K, Cox JA (1989) Amino acid sequence of crayfish troponin I. J Biol Chem 264:1551–1557
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Leise EM (1991) Evolutionary trends in invertebrate ganglionic structure. Neurosci 3:369–377
- Levine RJC, Kensler RW, Reedy MC, Hofmann W, King HA (1983) Structure and paramyosin content of tarantula thick filaments. J Cell Biol 97:186–195
- Linzen B, Gallowitz P (1975) Enzyme activity patterns in muscles of the lycosid spider, *Cupiennius salei*. J Comp Physiol 96:101–109
- Maier L, Root TM, Seyfarth E-A (1987) Heterogeneity of spider leg muscle: histochemistry and electrophysiology of identified fibers in the claw levator. J Comp Physiol B 157:285–294
- Manton SM (1958) Hydrostatic pressure and limb extension in arthropods. Ann Mag Nat Hist 13:161–182
- Melchers M (1963) Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* (Keyserling), einer amerikanischen Ctenide. Zool Jb Syst 91:1–90
- Melchers M (1967) Der Beutefang von *Cupiennius salei* Keyserling (Ctenidae). Z Morph Ökol Tiere 58:321–346
- Milde JJ, Seyfarth E-A (1988) Tactile hairs and leg reflexes in wandering spiders: physiological and anatomical correlates of reflex activity in the leg ganglia. J Comp Physiol A 162:623–631
- Moffett S (1975) Motor patterns and structural interactions of basi-ischiopodite levator muscles in routine limb elevation and production of autotomy in the land crab *Cardisoma guanhumi*. J Comp Physiol 96:285–305
- Moffett S (1996) Nervous system regeneration in the invertebrates. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Mücke A, Lakes R (1988) Das Experiment: Darstellung von Sinnesorganen und peripheren Nerven bei Insekten. Biologie in unserer Zeit 18:58–61

- Müller A, Wolf H, Galler S, Rathmayer W (1992) Correlation of electrophysiological, histochemical, and mechanical properties in fibres of the coxa rotator muscle of the locust, *Locusta migratoria*. J Comp Physiol B 162:5–15
- Mykles DL (1985) Heterogeneity of myofibrillar proteins in lobster fast and slow muscles: variants of troponin, paramyosin, and myosin light chains comprise four distinct protein assemblages. J Exp Zool 234:23–32
- Mykles DL (1988) Histochemical and biochemical characterization of two slow fiber types in decapod crustacean muscles. J Exp Zool 245:232–243
- Mykles DL, Medler S, Koenders A, Cooper R (2002) Myofibrillar protein isoform expression is correlated with synaptic efficacy in slow fibres of the claw and leg opener muscles of crayfish and lobster. J Exp Biol 205:513–522
- Nairn AC, Greengard P (1987) Purification and characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I from bovine brain. J Biol Chem 262:7273–7281
- Neil DM, Tobasnick G (1990) Myofibrillar protein heterogeneity reveals two slow fibre subtypes in the abdominal superficial flexor muscle of the Norway lobster. Proceedings of the physiological society 1989. J Physiol 420 p 118
- Nolte J, Pette D (1972) Microphotometric determination of enzyme activity in single cells in cryostat sections II. Succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and triosephosphate dehydrogenase activities in red, intermediate and white fibres of soleus and rectus femoris muscles of the rat. J Histochem Cytochem 20:577–582
- Padykula HA, Herman E (1955) The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. J Histochem Cytochem 3:170–195
- Palmgren P (1978) On the muscular anatomy of spiders. Acta Zoologica Fennici 155:1–41
- Palmgren P (1980) Some comments on the anatomy of spiders. Ann Zool Fennici 17:161–173
- Panek I, French AS, Seyfarth E-A, Sekizawa S-I, Torkkeli PH (2002) Peripheral GABAergic inhibition of spider mechanosensory afferents. Eur J Neurosci 16:96–104
- Parry DA (1960) The small leg nerve of spiders and a probable mechanoreceptor. Q J Microsc Sci 101:1–8
- Parry DA, Brown RHJ (1959) The hydraulic mechanism of the spider leg. J Exp Biol 36:423–433
- Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry 11:2627–2633

- Pette D, Staron RS (1993) The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *News Physiol Sci* 8:153–157
- Pringle JWS (1980) A review of arthropod muscle. In: Goldspink DF (ed) *Development and specialisation of skeletal muscle*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 91–105
- Quicke DL, Brace RC (1979) Differential staining of cobalt- and nickel-filled neurones using rubeanic acid. *J Microsc* 115:161–163
- Rathmayer W (1967) Elektrophysiologische Untersuchungen an Propriozeptoren im Bein einer Vogelspinne (*Eurypelma hentzi* Chamb.). *Z Vergl Physiol* 54:438–454
- Rathmayer W (2000) Motorische Steuerung bei Invertebraten. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (eds) *Neurowissenschaft*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 167–189
- Rathmayer W, Erxleben C (1983) Identified muscle fibers in a crab. I. Characteristics of excitatory and inhibitory neuromuscular transmission. *J Comp Physiol* 152:411–420
- Rathmayer W, Koopmann J (1970) Die Verteilung der Propriozeptoren im Spinnenbein. Untersuchungen an der Vogelspinne *Dugesia hentzi* Chamb. *Z Morph Tiere* 66:212–223
- Rathmayer W, Maier L (1987) Muscle fiber types in crabs: studies on single identified muscle fibers. *Amer Zool* 27:1067–1077
- Regenstein JM, Szent-Györgyi AG (1975) Regulatory proteins of lobster striated muscle. *Biochemistry* 14:917–925
- Reggiani C, Bottinelli R, Stienen GJM (2000) Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol Sci* 15:26–33
- Reichert H (2000) *Neurobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Reischig T, Stengl M (2002) Optic lobe commissures in a three-dimensional brain model of the cockroach *Leucophaea maderal*: a search for the circadian coupling pathways. *J Comp Neurol* 443:388–400
- Romeis B (1968) *Mikroskopische Technik*. Oldenbourg, München
- Rüdel R, Brenner B (2000) Muskeln und Motilität. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (eds) *Neurowissenschaft*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 145–165
- Rüegg JC (1971) Smooth muscle tone. *Physiol Rev* 51:201–248
- Rüegg JC (1986) *Calcium in muscle activation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Ruhland M, Rathmayer W (1978) Die Beinmuskulatur und ihre Innervation bei der Vogelspinne *Dugesiella hentzi* (Ch.) (Araneae, Aviculariidae). *Zoomorph* 89:33–46
- Sailer M (1992) Zur Regulation der Kontraktion von Sperrmuskeln – Untersuchung zu den Rezeptorwirkungsketten und den Proteinkinasen bei *Mytilus edulis*. Dissertation an der Universität Berlin
- Schäfer M (1991) Using the biocytin method for intracellular labelling of neurons in *Locusta migratoria*. In: Elsner N, Penzlin H (eds) Synapse-transmission-modulation. Proc 19th Göttingen neurobiology conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, p 352
- Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analyt Biochem* 56:502–514
- Schleicher M, Watterson DM (1983) Analysis of differences between coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Analyt Biochem* 131:312–317
- Sensenig AT, Shultz JW (2003) Mechanics of cuticular elastic energy storage in leg joints lacking extensor muscles in arachnids. *J Exp Biol* 206:771–784
- Seyfarth E-A (1985) Spider proprioception: receptors, reflexes, and control of locomotion. In: Barth FG (ed) *Neurobiology of arachnids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 230–248
- Seyfarth E-A (2002) Tactile body raising: neuronal correlates of a "simple" behavior in spiders. In: Toft S, Scharff N (eds) *European arachnology 2000*. Aarhus University Press, Aarhus, pp 19–32
- Seyfarth E-A, Barth FG (1972) Compound slit sense organs on the spider leg: mechanoreceptors involved in kinesthetic orientation. *J Comp Physiol* 78:176–191
- Seyfarth E-A, Pflüger H-J (1984) Proprioceptor distribution and control of a muscle reflex in the tibia of spider legs. *J Neurobiol* 15:365–374
- Seyfarth E-A, Eckweiler W, Hammer K (1985) Proprioceptors and sensory nerves in the legs of a spider, *Cupiennius salei* (Arachnida, Araneida). *Zoomorph* 105:190–196
- Seyfarth E-A, Gnatzy W, Hammer K (1990) Coxal hair plates in spiders: physiology, fine structure, and specific central projections. *J Comp Physiol A* 166:633–642
- Sherman RG (1985) Neural control of the heartbeat and skeletal muscle in spiders and scorpions. In: Barth FG (ed) *Neurobiology of arachnids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, pp 319–336

- Sherman RG, Luff AR (1971) Structural features of the tarsal claw muscles of the spider *Eurypelma marxi* Simon. Can J Zool 49:1549–1556
- Silverman H, Costello WJ, Mykles DL (1987) Morphological fiber type correlates of physiological and biochemical properties in crustacean muscle. Amer Zool 27: 1011–1019
- Sogl B, Gellissen G, Wiesner RJ (2000) Biogenesis of giant mitochondria during insect flight muscle development in the locust, *Locusta migratoria* (L.). Transcription, translation and copy number of mitochondrial DNA. Eur J Biochem 267:11–17
- Sohn J, Mykles DL, Cooper RL (2000) Characterization of muscles associated with the articular membrane in the dorsal surface of the crayfish abdomen. J Exp Zool 287: 353–377
- Stephenson DG, Williams DA (1981) Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. J Physiol 317:281–302
- Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. Histochemistry 92:453–457
- Tryba AK, Ritzmann RE (2000) Multi-joint coordination during walking and foothold searching in the *Blaberus* cockroach. II. Extensor motor neuron pattern. J Neurophysiol 83:3337–3350
- Tyrer NM, Altman JS (1974) Motor and sensory flight neurones in a locust demonstrated using cobalt chloride. J Comp Neural 157:117–138
- Vogel S (2000) Von Grashalmen und Hochhäusern: mechanische Schöpfungen in Natur und Technik. Wiley-VCh, Weinheim
- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biol Chem 244:4406–4412
- Weeks OI (1989) Vertebrate skeletal muscle: power source for locomotion. BioScience 39:791–799
- Weinstein RB, Full RJ (1992) Intermittent exercise alters endurance in an eight-legged ectotherm. Am J Physiol 262:852–859
- Weitkamp B, Jurk K, Beinbrech G (1998) Projectin-thin filament interactions and modulation of the sensitivity of the actomyosin ATPase to calcium by projectin kinase. J Biol Chem 273:19802–19808

- Wiens TJ, Wolf H (1993) The inhibitory motoneurons of crayfish thoracic limbs: identification, structures, and homology with insect common inhibitors. *J Comp Neurol* 336:261–278
- Wilson RS (1970) Some comments on the hydrostatic system of spiders (Chelicerata, Araneae). *Z Morph Tiere* 68:308–322
- Wilson RS, Bullock J (1973) The hydraulic interaction between prosoma and opisthosoma in *Amaurobius ferox* (Chelicerata, Araneae). *Z Morph Tiere* 74:221–230
- Wolf H (1990) Activity patterns of inhibitory motoneurons and their impact on leg movement in tethered walking locusts. *J Exp Biol* 152:281–304
- Yack JE (1993) Janus Green B as a rapid, vital stain for peripheral nerves and chordotonal organs in insects. *J Neurosci Meth* 49:17–22
- You M, Xuan X, Tsuji N, Kamino T, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K (2001) Molecular characterization of a troponin-I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol* 32:67–73
- Zebe E, Rathmayer W (1968) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spinnenmuskeln. *Zeitschrift für Zellforschung* 92:377–387
- Zite-Ferenczi F, Rüdel R (1978) A diffractometer using a lateral effect photodiode for the rapid determination of sarcomere length changes in cross-striated muscle. *Pflügers Arch* 374:97–100
- Zite-Ferenczi F, Häberle K-D, Rüdel R, Wilke W (1986) Correlation between the light diffraction pattern and the structure of a muscle fibre realized with Ewald's construction. *J Muscle Res Cell Mot* 7:197–214

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Roselotte und Albert Wied und Schwiegereltern Irmgard und Ferdinand Bickeböller und meinem Mann Ralf für die langjährige Betreuung Theresas und Jakobs während meiner Promotionszeit.

Dem Betreuer meiner Arbeit, Prof. Dr. Ernst-August Seyfarth, danke ich für die Überlassung des Themas, eines Arbeitsplatzes und seiner Literatursammlung sowie für seine konstruktiven Vorschläge und seine Geduld.

Herrn PD Dr. U. Niemann SJ danke ich vielmals für seine langjährige Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Manfred Kössl bedanke ich mich für seine Bereitschaft, Gutachter zu sein.

Meinem zeitweisen Kollegen Michael Kadel danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit.

Meine Ergebnisse zur Sarkomerlänge stammen von Forschungsaufenthalten bei Stefan Galler in den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. W. Rathmayer (Universität Konstanz) und Herrn Prof. Dr. A. Hermann (Universität Salzburg). Ich danke ihnen für die mir gewährte freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Die Experimente zur Proteinanalyse wurden von Herrn Prof. Dr. W. Volknandt betreut und mit Hilfe von Andrea Winter durchgeführt. Hierfür bin ich ihnen sehr dankbar.

Wertvolle methodische Tipps bei den Backfills verdanke ich Henning Schneider und Manfred Schmidt.

Mein Dank für die Hilfe am Elektronenmikroskop gilt Herrn Prof. Dr. Gnatzy und Beata Krebs.

Ulrike Grünert stellte uns dankenswerterweise den GABA-Antikörper, der wiederum von Frau Irena Wulle stammte, zur Verfügung.

Klaus Hammer danke ich für wertvolle Ratschläge und Hilfe bei der Histologie.

Herrn Walzer gilt mein Dank für die Anfertigung mehrerer Versuchsapparaturen in seiner Werkstatt.

Herrn Dr. Lothar Maier bin ich für seine Einführung in die histochemischen Nachweismethoden sehr dankbar.

Angelika Heidt-Golle danke ich für die vielen Fotoarbeiten in der Anfangsphase meiner Arbeit.

Frau Mostafawy und Klaus Grommet danke ich für die Vervollkommnung einiger meiner anatomischen Zeichnungen (Abb. 1, Abb. 22b).

Martin Jatho und Jessica Scheider danke ich für ihre kompetente Hilfe am PC.

Herrn Axel Stolps „know how“ bei Photoshop und seiner Geduld verdanke ich das Arrangement und die Beschriftung der meisten meiner Abbildungen.

Edith Monschauer sei für die Durchführung vieler Kopierarbeiten gedankt. Sie und Heike Hahn haben dankenswerterweise auch bei der Tierversorgung und Pflanzenpflege geholfen.

Meiner Freundin Christine Leist und Ernst-August Seyfarth danke ich vielmals für die kritische Durchsicht des Manuskripts der vorliegenden Arbeit.

Diese Arbeit wurde durch ein Wiedereinstiegsstipendium für Frauen im Rahmen des Zweiten Hochschulsonderprogrammes (HSP II) und mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 45/A3) unterstützt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christiane Bickeböller
 Geburt: 08.05.1962 in Frankfurt am Main, Eltern: Roselotte und Albert Wied
 Familienstand: seit 27.06.1986 verh. mit Ralf Bickeböller, Kinder: Theresa *22.04.1989,
 Jakob *23.06.1993
 Konfession: evangelisch

Schulische Ausbildung

1968–1972 Textor-Grundschule, Frankfurt am Main
 1972–1981 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Frankfurt am Main
 Juni 1981 Abitur

Universitätsstudium und wissenschaftliche Ausbildung

1981-1987 Biologiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
 April 1986 Diplomprüfung
 Juni 1986 bis April 1987 Diplomarbeit bei Prof. Dr. V. Bruns „Die postnatale Entwicklung des Cortischen Organs bei der Rennmaus *Pachyuromys duprasi*.“
 Oktober 1987 bis Februar 1988 Wissenschaftliche Hilfskraft im Anfängerpraktikum am Zoologischen Institut, Universität Frankfurt
 ab April 1988 Doktorarbeit im Arbeitskreis Neuroethologie bei PD Dr. Ernst-August Seyfarth am Zoologischen Institut, Universität Frankfurt
 April bis November 1988 Wissenschaftliche Hilfskraft im tierphysiologischen Praktikum und im Sonderforschungsbereich „Vergleichende Neurobiologie des Verhaltens“ (SFB 45/A3)
 Januar 1989 Forschungsaufenthalt bei Stefan Galler im Labor von Herrn Prof. Dr. W. Rathmayer, Universität Konstanz
 April bis Dezember 1989 Familien- und Hausarbeit
 Januar 1990 bis Juni 1993 Weiterführung der Promotion, halbtags, Forschungsaufenthalte bei Stefan Galler im Labor von Prof. Dr. W. Rathmayer, Universität Konstanz und Prof. Dr. A. Hermann, Universität Salzburg
 01.04.92–30.06.93 Wiedereinstiegsstipendium im Rahmen des Zweiten Hochschulsonderprogrammes (HSP II).
 Juni 1993 bis August 2000 Familien- und Hausarbeit, sporadischer Kontakt zur Arbeitsgruppe durch Seminarbesuche
 ab September 2000 Wiederaufnahme der Promotion: halbtags am Zoologischen Institut